Lipid-Protein-Filme zum Bau einfacher organisierter Systeme

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Fromherz

aus Ludwigshafen/Rhein

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Lipid-Protein-Filme zum Bau einfacher organisierter Systeme

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Fromherz

aus Ludwigshafen/Rhein

Marburg 1969

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV. LEIDEN BIBL.

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Philipps-Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 29. 11. 1969

Tag der mündlichen Prüfung am 17. 12. 1969

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kuhn

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. H. Müller

Meinem Vater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Lipide, Proteine, Membranen	1
2. Monomolekulare Lipid-Protein-Filme	3
a) Herstellung von Lipid-Protein-Filmen	
b) Messmethoden an Lipid-Protein-Filmen	
3. Die Adsorption von Proteinen an Lipidfilme	6
a) Messungen der Adsorptionsgeschwindigkeit	
b) Diskussion der Adsorptionskinetik	
4. Die Penetration von Proteinen in Lipidfilme	12
a) Schubanstieg und Penetration	
b) Messungen zur Penetration	
5. Struktur der adsorbierten Proteinschicht	25
a) Dicke	
b) Enzymatische Aktivität	
6. Proteine in organisierten Systemen	3o
a) Strahlungslose Energieübertragung	
b) Mehrfache Proteinschichten	
7. Wichtigste Ergebnisse, offene Probleme	38
8. Experimentelle Einzelheiten	42
a) Trog und Substanzen	
b) Arbeitstechnik	
9. Literaturverzeichnis	51

1. Lipide, Proteine, Membranen

Die Membranen vieler Zellorganellen sowie des Myelins bestehen aus Lipiden und Proteinen. Ueber die räumliche Anordnung dieser Komponenten gibt es die widersprüchlichsten Ansichten (vergl. Lehninger 1968). Es liegen hierzu elektronenoptische (Fernandez-Moran 1962, Racker 1966), röntgenographische (Finean 1961, Kreutz 1968) und spektroskopische (Wallach 1966 (ORD), 1968 (IR), Lenard 1966 (ORD), Chapman 1969 (NMR)) Untersuchungen vor. Gedeutet werden diese Experimente einerseits durch doppelte oder einfache Lipidschichten, die mit entknäueltem oder globulärem Protein belegt und durchwachsen sind (Abb. 1), andererseits durch einen Aufbau aus nebeneinanderliegenden Untereinheiten aus Lipiden und Proteinen (Green 1966).

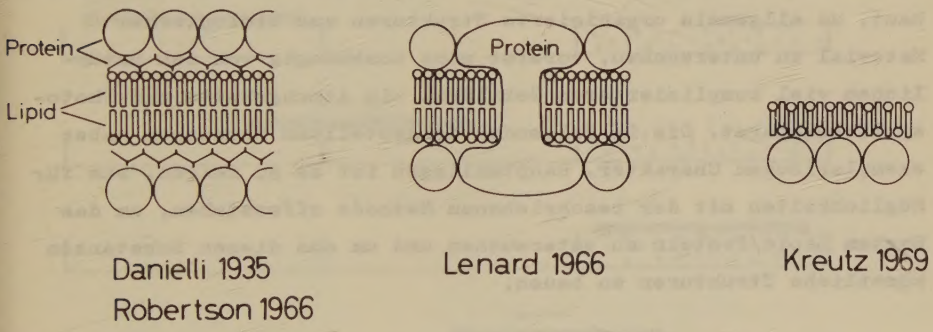


Abb. 1 Einige Modelle für die Struktur natürlicher Membranen.

Zur Ergänzung dieser Untersuchungen an biologischem Material sind Versuche an künstlichen Modellen nützlich, die einige Eigenschaften der postulierten Membranstrukturen zeigen.
Zur Klärung der Trenn- und Transporteigenschaften sind die bimolekularen schwarzen Membranen (Mueller 1964) besonders geeignet.

Um Informationen über die molekularen Kräfte zwischen den Lipiden und Proteinen zu erhalten, können monomolekulare Lipidfilme auf der Wasseroberfläche (Pockels 1895) nützlich sein. Adsorbiert man an solche Filme, bei denen die langgestreckten Lipidmoleküle senkrecht auf der Wasseroberfläche stehend dicht nebeneinandergepackt sind, von unten Proteine, so kann man Anordnungen erwarten, die einer halben Membran vom Danielli-Typ (Abb. 1) entsprechen. Von der Struktur her sind diese Oberflächenfilme weit von derjenigen einer natürlichen Membran entfernt. In dieser Arbeit wird deshalb nicht versucht, möglichst natürliche Membranlipide und Membranproteine zu untersuchen. Es werden im Gegenteil möglichst einfache, übersichtliche Lipidfilme und gut bekannte, lösliche Proteine verwendet, um allgemein etwas über die Wechselwirkung von Proteinen und Lipiden auszusagen. Mit dieser Information über das Verhalten von Lipid-Protein-Filmen ausgerüstet, werden dann künstliche Anordnungen aus Lipiden und Proteinen gebaut, um allgemein organisierte Strukturen aus biologischem Material zu untersuchen, vorerst ganz unabhängig von den natürlichen viel komplizierteren Gebilden, wie Atmungskette und Photosyntheseapparat. Die im folgenden dargestellten Messungen haben exemplarischen Charakter. Hauptanliegen ist es zu zeigen, was für Möglichkeiten mit der beschriebenen Methode offenstehen, um das System Lipid/Protein zu untersuchen und um aus diesen Substanzen künstliche Strukturen zu bauen.

2. Monomolekulare Lipid-Protein-Filme

a) Herstellung von Lipid-Protein-Filmen

Lipid-Protein-Filme werden durch Adsorption von gelösten Proteinmolekülen an einen monomolekularen Lipidfilm auf der Wasseroberfläche hergestellt. Dies geschieht auf folgende Weise:
Bei einem Trog mit mehreren Abteilungen (Abb. 2) wird auf der Wasseroberfläche des ersten Beckens zwischen zwei Barrieren ein Lipidfilm gespreitet (Auftropfen einer Chloroform-Lösung). Die beiden Barrieren werden mit dem Film über ein Becken mit Proteinlösung geschoben. Nach der Adsorption wird der Lipid-Protein-Film durch Zurückschieben von der Proteinlösung abgetrennt (Genaueres in § 8). Durch diese Methode ist es möglich, den fertigen Lipid-Protein-Film isoliert von der Proteinlösung zu untersuchen.

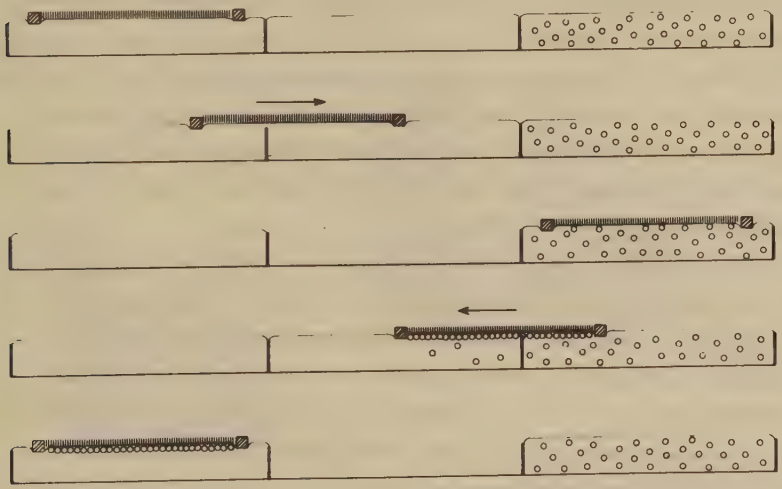


Abb.2 Schematische Darstellung der Herstellung eines Lipid-Protein-Films. Der Film bleibt beim Verschieben unverletzt. Man kann dies an einem fluoreszierenden Farbstoff-Lipid-Film beobachten (vergl. § 6a). Ein derartiger Film hat je nach Lipid eine Dicke von ca. 30 Å.

b) Messmethoden an Lipid-Protein-Filmen

Um aus Versuchen mit Lipid-Protein-Filmen Aussagen über die Kräfte zwischen Proteinen und Lipiden zu erhalten, wurden bisher (Schulman 1949, Eley 1956, 1957, Alexander 1963) Messungen der Oberflächenspannung verwendet:
Beim Spreiten eines Lipidfilms vermindert sich die Oberflächenspannung des Wassers. Der Film übt einen Schub (= Kraft/Länge) auf die einschliessenden Wände aus. Bringt man diesen Lipidfilm mit einem Schub von π_o = 5 dyn/cm über eine Proteinlösung, steigt der Schub (bei konstanter Filmfläche) an. Adsorbierende Proteinmoleküle dringen anscheinend ganz oder teilweise in den Film ein und drücken die Lipidmoleküle auseinander (Penetration). Aus Geschwindigkeit und Gesamtbetrag des Schubanstiegs bei verschiedenen Filmen und Proteinen wurde auf die Art der intermolekularen Kräfte geschlossen.
Für die Geschwindigkeit des Schubanstieges können aber, ausser der Diffusion, die eigentliche Adsorption, das Eindringen in den Film oder eine Proteinentknäuelung massgebend sein. Für alle drei Prozesse sind die Kräfte zwischen Lipidfilm und Proteinmolekül wichtig. Da der eigentliche Vorgang beim Schubanstieg vorerst unbekannt ist, ist es schwierig, aus solchen Versuchen allein eindeutige Aussagen zu erhalten.
Durch die im vorigen Abschnitt beschriebene neue Methode ist es möglich, Adsorption und Penetration getrennt zu untersuchen:
Zur Messung der Adsorptionsgeschwindigkeit von Proteinen muss man die adsorbierte Menge in Abhängigkeit von der Zeit bestimmen. Hierzu verschiebt man auf die beschriebene Weise einen Lipidfilm über die Proteinlösung, lässt eine bestimmte Zeit adsorbieren und schiebt dann den Film zurück. Aus diesem Lipid-Protein-Film entnimmt man eine Probe, indem man nach der Methode von Langmuir (1920) ein hydrophobes Glasplättchen durch den Film eintaucht und wieder herauszieht. Dabei lagert sich auf dem Gläschen ein doppelter Film ab (Abb. 3). Durch Bestimmung der Extinktion des Proteins kann man die Belegungsdichte des Films mit Protein-

molekülen bestimmen. Durch Probeentnahme zu verschiedenen Zeiten ist so die Adsorptionskinetik messbar. (§ 3)
Adsorbiert man an einen Film unter hohem Schub, ist die Penetration während der Adsorption gering (vergl. § 4a). Expandiert man plötzlich einen solchen Lipid-Protein-Film über proteinfreiem Substrat, so kann man die nun erfolgende Penetration allein verfolgen. (§ 4)
Mit Hilfe der Uebertragung des Lipid-Protein-Films auf einen Glasträger ist es möglich, interferometrisch die Dicke der Proteinschicht zu bestimmen. (§ 5a) Genauere Information über den Zustand der adsorbierten Proteinmoleküle erhält man durch die Kontrolle der katalytischen Aktivität von Enzymen. (§ 5b)
Die so erworbenen Kenntnisse über die Eigenschaften von Lipid-Protein-Filmen kann man schliesslich anwenden, um mit Hilfe der Langmuir'schen Aufziehtechnik organisierte Strukturen aus Lipiden und Proteinen zu bauen. (§ 6)

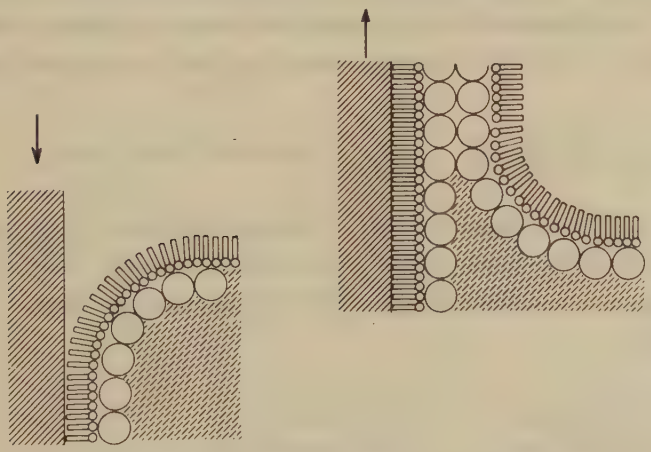


Abb. 3 Schema zur Uebertragung eines Lipid-Protein-Films auf einen hydrophoben Träger. Während des Aufziehens wird der Schub des Films konstant gehalten (vergl. § 8). Die Flächenabnahme des Films auf dem Wasser entspricht der bedeckten Trägerfläche.

3. Die Adsorption von Proteinen an Lipidfilme

a) Messung der Adsorptionsgeschwindigkeit

Die Adsorptionsgeschwindigkeit von Proteinen an Lipidfilme wird bestimmt, indem man zu verschiedenen Zeiten auf beschriebene Weise Filmproben entnimmt und die optische Extinktion des adsorbierten Proteins misst. Für jeden Messpunkt, also für jede Adsorptionszeit, wird dabei ein neuer Film hergestellt. Die Extinktion des aufgezogenen Films wird in einem Spektrometer (Bücher 1969) gemessen. Bezeichnet man mit I_o die einfallende, mit I die durchfallende Lichtintensität, so gilt für kleine Absorption Gl. 1.

Gl.1 $$\frac{I_o - I}{I_o} \approx \ln \frac{I}{I_o} = 2{,}3 \lg \frac{I}{I_o} = 2{,}3\ E \qquad E = \text{Extinktion}$$

Ist N die Anzahl der Proteinmoleküle pro Flächeneinheit und ε_{max} deren molarer dekadischer Extinktionskoeffizient im Absorptionsmaximum, so gilt, falls die Moleküle statistisch orientiert sind, Gl. 2.

Gl.2 $$E_{max} = \frac{N}{N_L} \cdot \varepsilon_{max} \qquad N_L = \text{Loschmidt'sche Zahl}$$

Nimmt man an, dass den adsorbierten Molekülen dasselbe ε_{max} zuzuschreiben ist wie in Lösung, und berücksichtigt man, dass sich auf einem Gläschen vier Proteinschichten befinden, kann man N berechnen nach Gl. 3.

Gl.3 $$N = \frac{N_L\, E_{max}}{\varepsilon_{max} \cdot 4} = \frac{N_L\, (I_o - I)}{\varepsilon_{max}\ I_o \cdot 2{,}3 \cdot 4}$$

Diese Methode wird nun auf oxydiertes Hämoglobin (Methämoglobin) angewendet. Die Extinktion wird im Maximum der Soretbande gemessen. Das Absorptionsmaximum liegt bei 412 nm gegenüber 406 nm in Lösung. Durch die Variation der polaren Filmgruppen, des pH-Wertes und der Proteinkonzentration ergeben sich Hinweise auf die Adsorptionskräfte zwischen Protein und Lipidfilm. (Abb. 4-7)

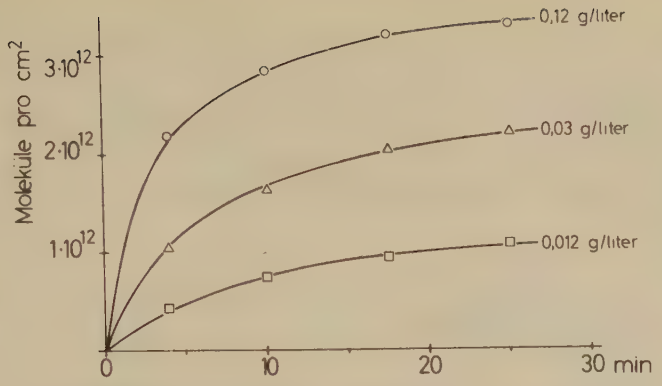


Abb. 4 Adsorbierte Hämoglobinmoleküle pro cm² in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Konzentrationen. Film: Stearinsäuremethylester, Anfangsschub π_o = 25-30 dyn/cm (konstante Filmfläche), 25°C, pH 7. Es ist auffällend, dass bei kleinen Konzentrationen (c) auch nach noch so langer Zeit nicht gleichviel adsorbiert wird wie bei hoher Konzentration. Ein Gleichgewicht scheint aber dennoch nicht vorzuliegen (vergl. Tab. 1). In § 3b wird gezeigt, dass die maximal adsorbierte Proteinzahl etwa einer einfachen dichtgepackten Proteinschicht entspricht.

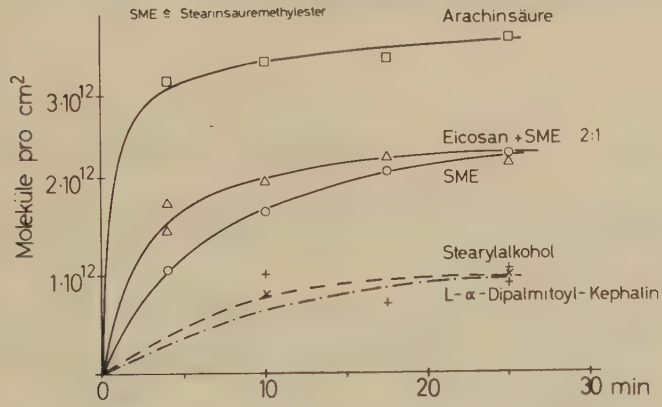


Abb. 5 Adsorbierte Hämoglobinmoleküle pro cm² in Abhängigkeit von der Zeit an Lipidfilmen mit verschiedenen polaren Gruppen. π_o = 25-30 dyn/cm, 25°C, pH 7, c = 0,03 g/lit. Zu beachten ist die schnelle Adsorption an die bei pH 7 weitgehend ionisierte Arachinsäure ($H_{39}C_{19}COOH$) (pK im Film 5,6 (Pethica 1956)). Das Beimischen des Paraffins Eicosan ($C_{20}H_{42}$) zu Stearinsäuremethylester vermindert die Adsorptionsgeschwindigkeit nicht. An die polaren Filme aus Stearylalkohol und Kephalin wird Hämoglobin nur in geringem Masse adsorbiert.

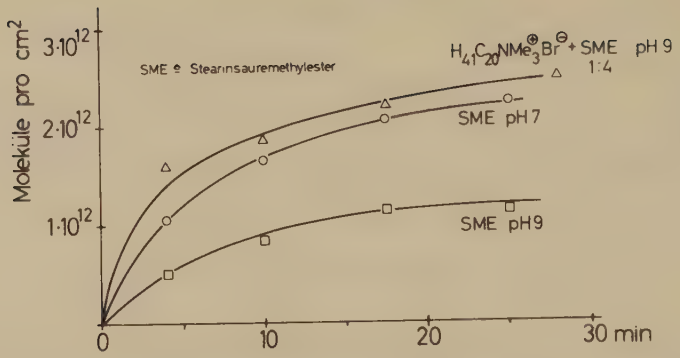


Abb. 6 Adsorbierte Hämoglobinmoleküle pro cm² in Abhängigkeit von der Zeit. Man erkennt die Bedeutung der elektrischen Ladungen: An den elektrisch neutralen Stearinsäuremethylesterfilm werden die bei pH 9 negativ geladenen Hämoglobinmoleküle langsamer adsorbiert als am isoelektrischen Punkt (pH 6,9). Diese Verminderung der Adsorptionsgeschwindigkeit kann kompensiert werden durch eine entgegengesetzte positive Ladung des Films.
(π_o = 25-3o dyn/cm, 25°C, c = o,o3 g/lit)

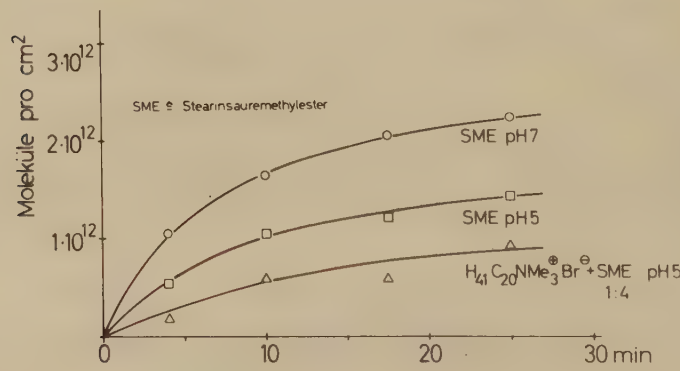


Abb. 7 Adsorbierte Hämoglobinmoleküle pro cm² in Abhängigkeit von der Zeit. Die Adsorptionsgeschwindigkeit an Stearinsäuremethylester wird auch durch eine positive Aufladung der Proteinmoleküle (bei pH 5) verlangsamt. Durch ebenfalls positive Ladungen am Film kann dieser Effekt noch verstärkt werden.
(π_o = 25-3o dyn/cm, 25°C, c = o,o3 g/lit)

Verwendet man hohe Proteinkonzentrationen, so erhält man den Sättigungswert der adsorbierten Molekülzahl. Durch Stehenlassen eines solchen Lipid-Protein-Films über proteinfreiem Substrat kann man feststellen, ob sich adsorbiertes Protein ablöst, d.h. ob die Adsorption reversibel ist. Die Resultate sind in Tab. 1 angegeben.

Adsorbat	Filmbildner	Moleküle/cm²	
		nach Adsorption	nach Stehenlassen
Hämoglobin	Stearinsäure-methylester	$3{,}9 \cdot 10^{12}$	$3{,}7 \cdot 10^{12}$
Hämoglobin	Arachinsäure	$3{,}8 \cdot 10^{12}$	$4{,}0 \cdot 10^{12}$

Tabelle 1 Maximale Adsorption von Hämoglobin und Kontrolle der Desorption. Adsorptions- und Desorptionszeit je 30 min, pH 7, c = 0,8 g/lit, 25° C, π_o = 25-30 dyn/cm. Die angegebenen Molekülzahlen sind innerhalb der Fehlergrenze gleich.

b) Diskussion der Adsorptionskinetik

Zuerst sei gezeigt, dass die gemessene Kinetik tatsächlich durch den Adsorptionsschritt bestimmt ist und nicht von der Diffusion abhängt.

Die mittlere Verschiebung Δx eines Moleküls in der Zeit Δt durch Diffusion beträgt nach Einstein-Smoluchowski

$$\Delta x = \sqrt{2D\Delta t} \qquad \text{(D ist der Diffusionskoeffizient)}$$

In einer Minute diffundieren die Hämoglobinmoleküle (D = $6{,}9 \cdot 10^{-7}$ cm²/sec , Mahler-Cordes 1967) innerhalb eines Abstandes von etwa $\Delta x = \sqrt{2 \cdot 7 \cdot 10^{-7} \cdot 60} = 10^{-2}$ cm

an den Film. Das sind bei c = 0,12 g/lit = 10^{15} Moleküle/cm³ $\Delta x \cdot c = 10^{13}$ Moleküle/cm²·min. Bei Stearinsäuremethylester werden anfänglich nur $8 \cdot 10^{11}$ Moleküle/cm²·min adsorbiert (Abb. 4) .

Die Diffusion ist folglich nicht geschwindigkeitsbestimmend. Es gibt tatsächlich eine Hemmung bei der Adsorption. Dass auch eine höhere Adsorptionsgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration möglich ist, zeigt der Versuch mit Arachinsäure (Abb.5). Die beträchtlichen Unterschiede der gemessenen Adsorptionsgeschwindigkeiten sind auf die verschiedenen Eigenschaften von Lipidfilmunterseite und Protein zurückzuführen:

Zunächst zur Wirkung der elektrischen Ladungen (Abb.6 und7). An den elektrisch neutralen Film aus Stearinsäuremethylester werden die Hämoglobinmoleküle beim isoelektrischen Punkt am schnellsten adsorbiert. Dass die Adsorption sowohl bei positiver als auch bei negativer Ladung des Proteins langsamer erfolgt, muss an der gegenseitigen Abstossung der Proteinmoleküle liegen. Die bereits adsorbierten Moleküle behindern die weitere Adsorption. Dies entspricht durchaus der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit von Proteinen (am unlöslichsten beim isoelektrischen Punkt, vergl. Mahler-Cordes 1966).
Die Bedeutung der elektrischen Ladungen bei der Assoziation von Lipiden und Proteinen wird noch deutlicher gezeigt bei geladenen Lipidfilmen. Gleiche Ladung von Protein und Lipid vermindert die Adsorption, entgegengesetzte Ladung erhöht sie.

Die Beeinflussung der Adsorptionsgeschwindigkeit durch andere polare Filmgruppen ist nicht so einfach zu deuten (Abb.5). Es ist auffallend, dass die Adsorption an die polaren Filme aus Stearylalkohol und Kephalin bedeutend langsamer erfolgt als an die Filme aus Stearinsäuremethylester und Eicosan/Stearinsäuremethylester, bei denen nur unpolare Gruppen ($-CH_3$) ins Wasser ragen. Man muss hier wohl die Veränderung der Wasserstruktur in Filmnähe berücksichtigen, die den Zutritt der Proteinmoleküle zum Film beeinflussen kann. Bei Stearylalkohol und Kephalin kann durch Bildung von Wasserstoffbrücken eine Verfestigung des Wassers eingetreten sein (Davies 196o). Das Durchbrechen dieser Grenzschicht verlangsamt die Adsorption der Proteinmoleküle.

Bei den Filmen aus Stearinsäuremethylester und Eicosan/Stearinsäuremethylester, die sich bezüglich der Adsorption ähnlich verhalten (vergl. dagegen die Penetration in Abb. 11), kann sich um die unpolaren Gruppen ein Frank-Evans-Eisberg (1945) ausbilden, dessen festere Struktur (Hertz 1964) ebenfalls durch die adsorbierenden Proteinmoleküle aufgebrochen werden muss.
Die hohe Adsorptionsgeschwindigkeit an Arachinsäure bei pH 7 (Abb.5) kann durch den strukturbrechenden Einfluss der ionisierten Carboxylgruppen bewirkt sein, wie er von vielen gelösten Ionen her bekannt ist (Hertz 1968).

Für die Kenntnis der Struktur des Lipid-Protein-Films ist die maximale adsorbierte Molekülzahl wichtig wie auch die Frage, ob bei der Adsorption ein Gleichgewicht vorliegt. Aus Tab.1 sieht man, dass eine Desorption über proteinfreiem Substrat nicht erfolgt. *) Die einmal angehefteten Moleküle lösen sich vom Film nicht mehr ab. Aus der Molekülzahl von $4 \cdot 10^{12}$ Moleküle/cm² folgt, dass ein Molekül Hämoglobin eine Fläche von $f = 2500$ Å² besetzt. Nimmt man an, dass die adsorbierten Moleküle kugelförmig sind und in dichtester Packung adsorbiert werden (Abb.8), berechnet man nach Gl. 4 als Durchmesser 2r den Wert 54 Å.

Gl.4 $$f = 6\,\frac{s \cdot r}{2} = \frac{6 \cdot 2r^2}{2 \cdot \sqrt{3}} \; ; \quad 2r = \sqrt{\frac{f}{2\sqrt{3}}} = 54 \text{ Å}$$

Nach der Röntgenstrukturanalyse (Perutz 1962) kann Hämoglobin durch ein Ellipsoid mit den Hauptachsen von 64, 55, 50 Å approximiert werden. Es erscheint demnach gerechtfertigt,

---

*) Manchmal wurde in den ersten Minuten aus der Extinktion ein Abfall der adsorbierten Proteinmenge um ca. 20% festgestellt, danach blieb die Extinktion unverändert. Entweder sind dabei die letzten Moleküle schwächer gebunden, oder es werden Proteinmoleküle beim Verschieben in der Wassergrenzschicht unter dem Film mitgeschleift und aufgezogen, bevor sie abdiffundieren können (§ 8b).

den Lipid-Hämoglobin-Filmen eine Struktur gemäss Abb.8 zuzuschreiben. Auch bei hoher Proteinkonzentration wird also nur eine Proteinschicht adsorbiert. Bisher (Eley 1956, 1957) wurde aus indirekteren Messungen (vergl. § 7) geschlossen, dass zwei und mehr Proteinschichten adsorbiert werden können.

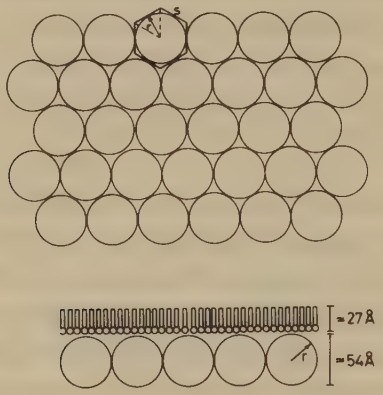


Abb.8 Schematische Zeichnung eines Lipid-Protein-Films

4. Die Penetration von Proteinen in Lipidfilme

Bei der Adsorption von Proteinen an einen Lipidfilm stellt man eine Erniedrigung der Oberflächenspannung bzw. eine Erhöhung des Schubes fest. Eine genauere Untersuchung dieses Effektes soll der Klärung folgender Fragen dienen: Was passiert mit dem Proteinmolekül bei der Adsorption? Dringt es ganz in den Film ein? Wird es dabei entknäuelt? Oder dringen nur einzelne hydrophobe Seitenketten zwischen die Lipidmoleküle?
Um die verschiedenartigen Experimente diskutieren zu können, bzw. um aus den makroskopischen Schub- und Flächenmessungen auf die

obigen molekularen Fragestellungen zu antworten, wird im folgenden Abschnitt ein Modell dargelegt, mit dem man das Entstehen des Schubanstieges erklären kann.

a) Schubanstieg und Penetration

Vermindert man von aussen die einem Film zur Verfügung stehende Fläche, so erhöht sich bei konstanter Temperatur der Schub (Schub-Flächen-Isotherme). Die bei der Proteinadsorption festgestellte Schuberhöhung kann man ebenso darauf zurückführen, dass den Lipidmolekülen Platz verloren geht durch Protein, das in den Film eindringt. Der Schubanstieg hängt dann von der durch das Protein besetzten Filmfläche ab. Diese wiederum wird durch die Anzahl eingedrungener Proteinteile bestimmt.
Bezeichnet man mit π den Schub, mit f die Fläche pro Lipidmolekül, mit n die Anzahl der pro Flächeneinheit eingedrungenen Proteinteile (vorerst unbekannter Art) und mit t die Zeit, so gilt für die Geschwindigkeit des Schubanstieges Gl. 5.

Gl.5 $$\frac{d\pi}{dt} = \frac{d\pi}{df} \cdot \frac{df}{dn} \cdot \frac{dn}{dt}$$

$\frac{d\pi}{df}$ erhält man aus der Schub-Flächen-Isotherme des reinen Lipidfilms. Im folgenden nehmen wir eine lineare Abhängigkeit des Schubes von der Filmfläche nach Gl. 6 an. Dabei ist der Ordinatenabschnitt a eine positive, die Steigung b eine negative Konstante.

Gl.6 $$\pi = a + b f$$

Die Grösse n ist durch die Beziehung in Gl. 7 gegeben.

Gl.7 $$\varphi n = (f_o - f) \cdot \frac{1}{f_o} \quad ; \quad \varphi = \text{Querschnitt einer penetrationsfähigen Gruppe}$$

Dabei bezeichnet f_o die Fläche pro Lipidmolekül vor der Penetration des Proteins. Durch Ableiten von Gl. 7 erhält man $\frac{dn}{df}$ (Gl.8).

Gl.8 $$\frac{dn}{df} = -\frac{1}{f_o} \cdot \frac{1}{\varphi}$$

Setzt man die lineare Abhängigkeit des Schubes von der Fläche f (Gl. 6) in Gl. 7 und Gl. 8 ein, so erhält man Gl. 9 bzw. Gl.1o. Darin bedeutet π_o den zu f_o gehörenden Anfangsschub.

Gl.9 $$n = \frac{\pi - \pi_o}{(a - \pi_o) \cdot \varphi}$$; Gl.1o $$\frac{dn}{df} = \frac{b}{(a - \pi_o) \cdot \varphi}$$

Die Eindringgeschwindigkeit $\frac{dn}{dt}$ hängt ab von der Anzahl der unter dem Film liegenden noch freien Gruppen, sowie von der Wahrscheinlichkeit, mit der über einer penetrationsfähigen Gruppe ein Loch im Film entsteht. Besetzt eine Gruppe eine Fläche φ, so ist die Wahrscheinlichkeit dafür, dass durch Fluktuation ein solches Loch entsteht, proportional exp $(- \pi \varphi / kT)$ (k Boltzmannkonstante, T Temperatur; vergl. Landau-Lifschitz 1966). Berücksichtigt man noch eine Rückreaktion, so erhält man Gl.11. Darin bezeichnet man mit n_o die Gesamtzahl penetrationsfähiger Gruppen pro Flächeneinheit.

Gl.11 $$\frac{dn}{dt} = k_1 (n_o - n) e^{-\pi\varphi/kT} - k_2 n$$

Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 hängen von den spezifischen Eigenschaften des Films und des Proteins, sowie von anderen äusseren Parametern ab. Nimmt man an, dass ein adsorbiertes Proteinmolekül m eindringfähige Gruppen besitzt, so kann man n_o nach Gl.12 ersetzen durch die messbare Anzahl N der Proteinmoleküle pro Flächeneinheit.

Gl.12 $$n_o = m N$$

Setzt man nun Gl. 9 und Gl.12 in Gl.11 ein und danach Gl.1o und Gl.11 in Gl. 5, und bezeichnet man $\pi - \pi_o$ mit $\Delta\pi$, so erhält man für die Geschwindigkeit des Schubanstiegs Gl.13.

Gl. 13

$$\frac{d\Delta\pi}{dt} = \left[k_1 Nm(a-\pi_o)e^{-\pi_o\varphi/kT} - k_1 e^{-\pi_o\varphi/kT}.\Delta\pi\right] e^{-\Delta\pi\varphi/kT} - k_2\Delta\pi$$

Zu bemerken ist bei dieser Beziehung, dass von den Filmeigenschaften nur die Konstanten a und π_o einen Einfluss haben. Von den Proteineigenschaften erscheint explizit nur die Fläche φ der eindringfähigen Gruppen.
Es sei nun der stationäre Zustand betrachtet: Man setzt also $\frac{d\Delta\pi}{dt} = 0$ und erhält damit Gl.14 bzw. Gl.14a.

Gl.14 $$N = \frac{\Delta\pi}{m\varphi(a-\pi_o)}\left[1 + \frac{k_2}{k_1} e^{\pi_o\varphi/kT} e^{\Delta\pi\varphi/kT}\right]$$

Gl.14a $$\Delta\pi = \frac{Nm\varphi(a-\pi_o)}{1 + \frac{k_2}{k_1} e^{\pi_o\varphi/kT} e^{\Delta\pi\varphi/kT}}$$

Nach diesen Gleichungen hängt der Schubanstieg $\Delta\pi$ von der adsorbierten Anzahl N der Proteinmoleküle und vom Anfangsschub π_o ab. Unbekannt sind in Gl. 14 m, φ und k_2/k_1 . Durch Anpassen dieser Parameter lässt sich aus der experimentell zu gewinnenden Beziehung zwischen N und $\Delta\pi$ die Fläche φ der eindringfähigen Gruppen bestimmen. Weiter kann man aus Gl.14 folgendes ablesen:
Gibt es keine Rückreaktion, ist also $k_2 = 0$, so beträgt der Nenner in Gl.14a 1 : Der Schub steigt linear mit der adsorbierten Proteinmenge N an, die gesamte eindringfähige Fläche $Nm\varphi$ dringt in den Film ein. Gibt es eine Rückreaktion ($k_2 \neq 0$), so ist $\Delta\pi$ geringer. Da $\Delta\pi$ im Nenner von Gl.14a nochmals vorkommt, wird die Abweichung von der Geraden mit zunehmendem Schubanstieg grösser. Der Betrag dieser Krümmung der $\Delta\pi(N)$-Kurve wird durch die Fläche φ der eindringfähigen Gruppen bestimmt. Eine Erhöhung des Anfangsschubes π_o verstärkt diese Abweichung von der maximalen Penetration. Es gibt aber keinen bestimmten hohen Anfangsschub, bei dem eine Penetration ganz ausgeschlossen ist.

b) Messungen zur Penetration

Um die Kinetik des Schubanstieges unabhängig von der Adsorptionskinetik zu messen, wird das Protein an einen Film mit hohem Anfangsschub (ca. 45 dyn/cm) adsorbiert. Dabei dringt nur sehr wenig Protein in den Film ein. Dieser Lipid-Protein-Film wird dann über proteinfreies Substrat verschoben. Mit Hilfe eines Glasplättchens wird wie üblich eine Filmprobe entnommen zur Bestimmung der adsorbierten Proteinmenge. Darauf vergrössert man die Filmfläche plötzlich so weit, dass der Film nur noch unter einem bestimmten kleinen Schub steht. Nun können die bereits adsorbierten Proteinmoleküle eindringen: Der Schub steigt wieder an.

Da die Schub-Flächen-Isotherme von Arachinsäure im Bereich von 5 - 26 dyn/cm linear und somit zur Auswertung der Messungen nach Gl.14 besonders geeignet ist, wird im folgenden Hämoglobin an einen Arachinsäurefilm bei pH 5 adsorbiert. Nach Bücher (1967) beträgt die Steigung $b = -6{,}5$ dyn/cm·Å² und der Ordinatenabschnitt $a = 150$ dyn/cm. Für zwei Filme mit verschieden dichter Hämoglobinbelegung ist in Abb.9 der Schubanstieg in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Es ist sichtbar, dass die kleinere Anzahl Hämoglobinmoleküle einen geringeren Schubanstieg hervorbringt. Expandiert man den Film ein zweites Mal auf 5 dyn/cm, so steigt der Schub nochmals an, aber weniger hoch. Ein $\Delta\pi$ von 18 dyn/cm entspricht einer eingedrungenen Fläche von $n\varphi = 0{,}12$ cm^2 pro cm^2 Film (Gl.9). Entspricht die gesamte penetrierfähige Fläche $m\varphi$ eines Proteinmoleküls seinem nativen Querschnitt von 2500 Å², so fallen für eine zweite Penetration ca. $5 \cdot 10^{11}$ Moleküle/cm² weg. Man erwartet dabei aus Abb.10 für $3 \cdot 10^{12}$ Moleküle ein $\Delta\pi = 17$ dyn/cm. Für eine dritte Penetration erwartet man so ca. 16 dyn/cm. Die kleine Abweichung von den gemessenen (Abb.9) 16 bzw. 14 dyn/cm liegt im Bereich der Fehlergrenze von Abb.10. Die Abhängigkeit des Maximalschubes von der Anzahl adsorbierter Proteinmoleküle kann man auch messen, wenn man das Hämoglobin direkt an einen Film mit einem $\pi_o = 5$ dyn/cm adsorbiert und gleichzeitig penetrieren lässt. Man unterbricht dann die

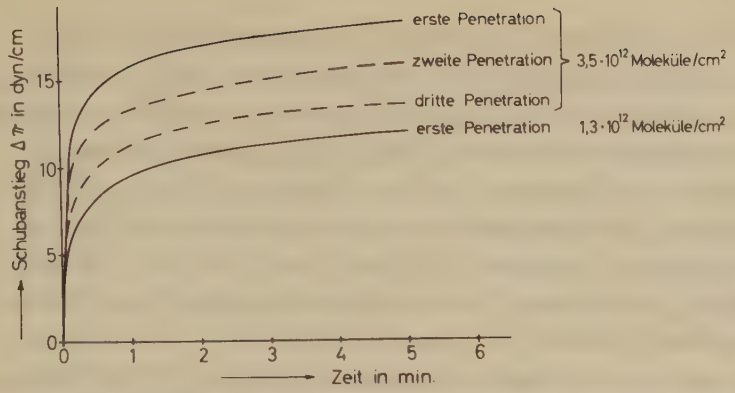


Abb.9 Schubanstieg in Abhängigkeit von der Zeit bei der Penetration von Hämoglobin in einen Arachinsäurefilm bei pH 5. Die Penetration erfolgt unabhängig von der Adsorption bei einem Anfangsschub π_o = 5 dyn/cm. Eingezeichnet sind die Kurven für zwei verschieden dicht mit Hämoglobin bedeckte Filme. Im einen Fall wurde die Expansion und damit die Penetration zweimal wiederholt. (Der Schub ist kontinuierlich mit einem Schreiber gemessen.)

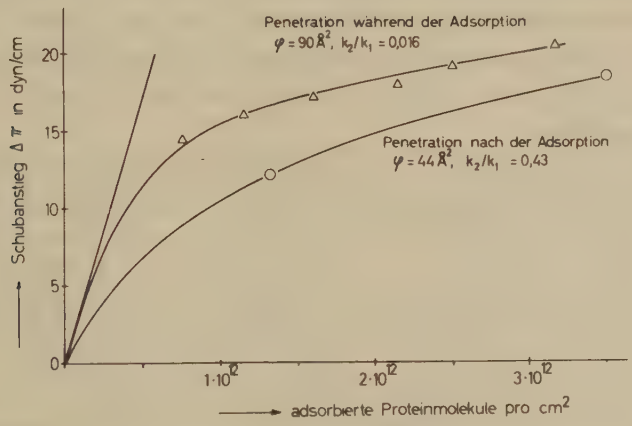


Abb.10 Schubanstieg in Abhängigkeit von der adsorbierten Hämoglobinmenge pro cm² bei der Penetration in einen Arachinsäurefilm bei pH 5. o Penetration nach der Adsorption (aus Abb.9), Δ Penetration während der Adsorption. Die eingezeichneten Kurven sind nach Gl.14 angepasst (vergl. Text). Die Gerade zeigt den Schubanstieg, der sich ergeben müsste, wenn alle adsorbierten Hämoglobinmoleküle mit ihrem gesamten unveränderten Querschnitt von ca. 2500 Å² in den Film eindringen würden.

Adsorption zu verschiedenen Zeiten und vergleicht die wie üblich gemessene adsorbierte Proteinmenge mit dem bis dahin erreichten Schub. Dieses Verfahren lässt sich besser vergleichen mit den Experimenten von Eley (1956, 1957), aus denen er auf eine Belegung des Films mit mehreren Proteinschichten schloss (vergl. § 7). Wählt man nicht zu kurze Adsorptionszeiten, so kann man annehmen, dass das Penetrationsgleichgewicht nahezu erreicht ist, da man aus Abb. 9 erkennt, dass der Hauptschubanstieg nach drei bis fünf Minuten beendet ist. In Abb. 1o sind die auf solche Weise gewonnenen Messpunkte (für jeden Messpunkt wurde ein neuer Film hergestellt) und die beiden aus Abb. 9 zu entnehmenden $\Delta\pi$-Werte in Abhängigkeit von der adsorbierten Proteinmenge aufgetragen.

Um die Messpunkte in Abb.1o nach Gl. 14 genau auswerten zu können, wären genauere Messungen bei verschiedenen Anfangsschüben nötig. Es ist aber bis jetzt nicht gelungen, befriedigend reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Obwohl die Messungen von Abb.1o nur einen qualitativen Charakter haben, sei doch mit ihrer Hilfe die Fläche φ der penetrierenden Gruppen abgeschätzt.

Es sei die Annahme gemacht, dass $m\varphi$, also die gesamte penetrierfähige Fläche eines Hämoglobinmoleküls dem Querschnitt dieses Moleküls entspricht, d.h., dass $m\varphi = 25oo$ Å^2 beträgt. Damit müssen nur noch die beiden Parameter φ und k_2/k_1 angepasst werden. Für die Penetration während der Adsorption erhält man so aus Gl. 14 $\varphi = 9o$ Å^2, $k_2/k_1 = o,o16$, für die Penetration nach der Adsorption $\varphi = 44$ Å^2, $k_2/k_1 = o,42$. Es scheint demnach, dass im Mittel nur kleine Teile der Proteinmoleküle (z.B. Kettensegmente, Aminosäureseitenketten) zwischen die Lipidmoleküle eindringen. Der Wert von φ hängt empfindlich von der Krümmung der $\Delta\pi(N)$-Kurve ab (vergl. Gl.14). Die Krümmung wird im wesentlichen durch die Messpunkte bei kleinem Schubanstieg bestimmt (Abb.1o). Diese sind nicht sehr zuverlässig (vergl. Diskussion von Abb.13 Seite 23). Der Unterschied von φ in den beiden Fällen ist deshalb kaum signifikant.

Auch sonst werden die Aussagen von Gl.14 bestätigt: Man erwartet, dass $\Delta\pi$ bei wachsendem Anfangsschub π_o und gleicher adsorbierter Proteinmenge kleiner wird, falls die Steigung der Schub-Flächen-Isotherme gleichbleibt. Wird der Abfall der Schub-Flächen-Isotherme mit zunehmendem Schub steiler, steigt also der Ordinatenabschnitt a mit abnehmender Filmfläche, so erwartet man, dass $\Delta\pi$ grösser wird. Das wird tatsächlich beobachtet: Bei einem Arachinsäurefilm nimmt die Filmfläche beim Erhöhen des Schubes von 5 bis 26 dyn/cm linear ab mit einem Ordinatenabschnitt a = 15o dyn/cm und einer Steigung b = -6,5 dyn/cm·Å² (Bücher 1967). Erhöht man π_o in diesem Bereich, so wird $\Delta\pi$ kleiner. Bei 26 dyn/cm steigt der Schub mit abnehmender Fläche plötzlich stärker an (a = 3ooo dyn/cm, b = -15o dyn/cm·Å² ; Bücher 1967). Dementsprechend findet man, dass bei π_o-Werten von 3o - 35 dyn/cm die Höhe des Schubanstiegs durch Penetration derjenigen bei Anfangsschüben von 15 - 2o dyn/cm entspricht. Auch bei den höchsten erreichbaren Anfangsschüben (π_o = 55 dyn/cm) tritt noch ein deutlicher Schubanstieg durch Penetration auf.

Unmittelbar beobachtet man diesen Einfluss der Schub-Flächen-Isotherme auf die Grösse des Schubanstiegs bei der Penetration in einen Stearinsäuremethylesterfilm. Bei der Kompression dieses Films steigt der Schub mit abnehmender Fläche bei 1o dyn/cm plötzlich steiler an. Adsorbiert man Hämoglobin an einen Stearinsäuremethylesterfilm bei 5 dyn/cm Anfangsschub und verfolgt den Schubanstieg bei konstanter Fläche, so sieht man aus Abb.11, dass die Schubanstiegsgeschwindigkeit tatsächlich plötzlich steiler wird, sobald 1o dyn/cm erreicht sind.

Es ist bemerkenswert, dass die Penetration für die Adsorption der Proteinmoleküle unwichtig ist: Unter gleichen Bedingungen (Film, pH-Wert, Konzentration, Adsorptionszeit) werden bei π_o-Werten von 5, 25 und 45 dyn/cm praktisch gleichviele Hämoglobinmoleküle pro Flächeneinheit adsorbiert (vergl. Abb.4 und 1o).

Die Penetration unterliegt auch zum Teil anderen Einflüssen als die Adsorption.
Durch Beimischen von Eicosan zu einem Stearinsäuremethylesterfilm wird die Penetration stark verlangsamt (Abb.11), während die Adsorption nur wenig beeinflusst wird (Abb. 5). Man bemerkt, dass der Knick, der beim reinen Stearinsäuremethylesterfilm durch die Schub-Flächen-Isotherme dieses Films bedingt ist, verschwindet, dass aber nun der Schub erst nach einer Induktionsperiode ansteigt. Dieses zeitlich verzögerte Eindringen der Proteingruppen in den Film entspricht der bekannten Kinetik einer Folgereaktion, bei der das Endprodukt erst nach einer Induktionsperiode erscheint. Man muss demnach schliessen, dass der eigentlichen Penetration ein anderer Prozess vorgelagert ist, der durch das Beimischen des Paraffins verlangsamt wird. Da aber die Adsorption fast unbeeinflusst ist (Abb. 5), muss noch eine Zwischenreaktion postuliert werden.

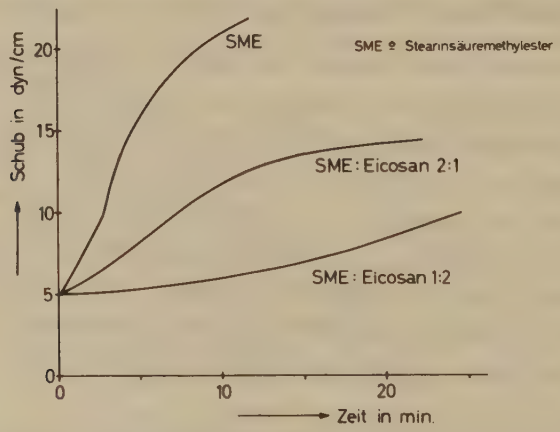


Abb.11 Schub in Abhängigkeit von der Zeit bei der Penetration von Hämoglobin in Mischfilme aus Stearinsäuremethylester (SME) und Eicosan. Die Penetration erfolgt während der Adsorption. c = 2,4 mg/lit, pH 7, 25°C. Beim reinen Stearinsäuremethylesterfilm ist der Knick bei 1o dyn/cm zu beachten (vergl.Seite 19). Das Beimischen von unpolarem Eicosan ($C_{2o}H_{42}$) verlangsamt die Penetration deutlich.

Eine mögliche Erklärung für diese Erscheinung ist folgende: Die eindringfähigen Teile des Proteins müssen erst "hergestellt" werden, indem das Proteinmolekül ein wenig entknäuelt wird, wobei z.B. die Kettensegmente beweglicher werden und hydrophobe Aminosäurereste freigelegt werden. Diese Entknäuelung wird durch den unpolaren Eicosanfilm weniger unterstützt als durch polare Filme. Falls diese Vorstellung richtig ist, muss man die Kinetik von § 4a durch folgendes Reaktionsschema ersetzen:

adsorbiertes Protein $\longrightarrow$ penetrierfähige Gruppen $\rightleftharpoons$ penetrierte Gruppen

In Gl.14, die den stationären Zustand beschreibt, geht nur die Gesamtzahl $n_o = Nm$ der penetrierfähigen Gruppen ein. An der Form von Gl.14 ändert sich bei Berücksichtigung einer solchen vorgelagerten Reaktion nichts.
Andrerseits schliesst man aus dieser Ueberlegung, dass bei einem schon in Lösung entknäuelten, d.h. bei einem denaturierten Protein von vornherein mehr Gruppen m pro Proteinmolekül freigelegt

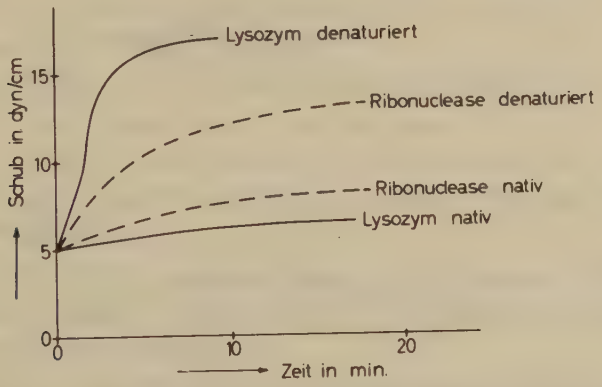


Abb.12 Schub in Abhängigkeit von der Zeit bei der Penetration von nativem und denaturierten Proteinen (Lysozym und Ribonuclease), in einen Stearinsäuremethylesterfilm während der Adsorption. c = 2,4 mg/lit, pH 7, 25°C. Denaturiert wurde durch dreistündiges Erhitzen(auf 60°C)der Proteinlösung.

sind, dass damit also die Penetration schneller erfolgen müsste als bei nativem Protein. Dies ist auch tatsächlich der Fall, wie man aus Abb.12 ersehen kann:
Bei den durch S-Brücken stabilisierten Knäueln von Lysozym und Ribonuclease verläuft der Schubanstieg besonders langsam. Nach vorangehender Hitzedenaturierung steigt der Schub - bei sonst gleichen Bedingungen - erheblich schneller und zu grösseren Werten an: Es sind mehr penetrierfähige Gruppen vorhanden, und sie müssen nicht erst nach der Adsorption "hergestellt" werden.

Verschiedene bis dahin dargelegte Vorstellungen über die Penetration werden durch ein andersartiges Experiment bestätigt: Das Protein wird dabei an einen Film unter hohem Schub (π_o= 45 dyn/cm) adsorbiert und über proteinfreies Substrat verschoben. Der Schub wird nun plötzlich vermindert und auf diesem kleineren Wert konstant gehalten (vergl. § 8). Die adsorbierten Proteinmoleküle können nun penetrieren und vergrössern dabei die ursprüngliche Filmfläche. Aus Abb.13 kann man erkennen, dass

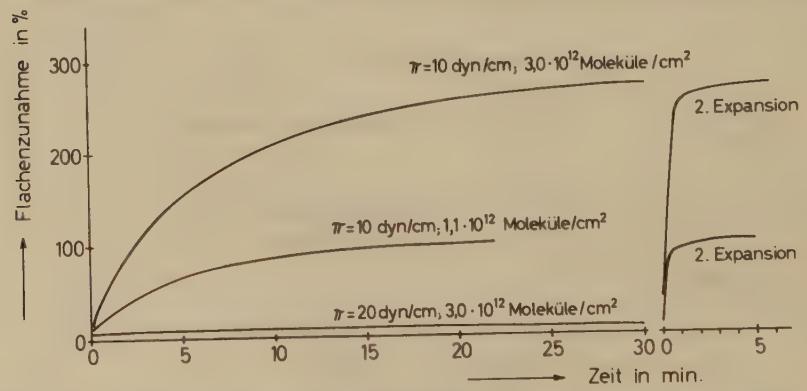


Abb.13 Prozentuale Vergrösserung der Filmfläche in Abhängigkeit von der Zeit bei der Penetration von Hämoglobin in einen Arachinsäurefilm unter konstantem Schub bei pH 7 und 25°C. Die zwischen den beiden Expansionen desselben Films erfolgte Kompression (bei 3o dyn/cm) ist nicht eingezeichnet, da deren Geschwindigkeit durch den Apparat begrenzt ist. Die beigefügten Zahlen bezeichnen den vorgegebenen Schub und die adsorbierte Hämoglobinmenge. Die fast momentane kleine Flächenzunahme am Beginn der Kurve wird durch die Expansion des Lipids bewirkt.

die Fläche eines Arachinsäurefilms durch Penetration von adsorbiertem Hämoglobin bei 1o dyn/cm um etwa 3oo% zunimmt, obwohl die adsorbierten Hämoglobinmoleküle vor der Penetration nur etwa 3/4 des Lipidfilms besetzen (vergl. Seite 11). Ist weniger Hämoglobin adsorbiert, ist auch die Flächenzunahme entsprechend geringer. Bei einem konstanten Schub von 2o dyn/cm vergrössert sich die Fläche durch Penetration kaum.

Erhöht man den äusseren Schub wieder auf 3o dyn/cm, so weicht der Film diesem Zwang so schnell aus, dass die Geschwindigkeit der Flächenverkleinerung anfänglich durch den Apparat begrenzt ist. Die dabei erreichte Fläche ist nur wenig grösser als die ursprüngliche (Abb.13). Die Penetration ist also sogar in diesem extremen Fall zum grössten Teil reversibel.

Vermindert man nochmals den Schub auf 1o dyn/cm, so vergrössert sich die Fläche bedeutend schneller als beim ersten Mal bis auf die vorher erreichte Fläche (Abb.13). Daraus kann man schliessen, dass bei der ersten Penetration das Protein verändert wurde,und dass die Geschwindigkeit der Flächenzunahme dabei nicht durch die eigentliche Penetration bestimmt wurde, sondern durch diese Umwandlung der Proteinmoleküle.

Dieses Experiment zeigt demnach:

1. Bei 1o dyn/cm können ganze Hämoglobinmoleküle in einen Arachinsäurefilm eindringen, bei 2o dyn/cm nicht.
2. Geschwindigkeitsbestimmend für den Schubanstieg kann eine mit der eigentlichen Penetration verbundene Entknäuelung des Proteinmoleküls sein (vergl. Seite 21).
3. Die Penetration, sogar von ganz eingedrungenen und z.T. entknäuelten Hämoglobinmolekülen, ist weitgehend umkehrbar durch Erhöhen des Schubes.

Diese Gesichtspunkte muss man berücksichtigen bei der Penetration bei konstanter Fläche (vergl. Seite 18). Wählt man dort einen Anfangsschub von 5 dyn/cm, so können anfänglich ganze Hämoglobinmoleküle in den Film eindringen. Da später durch den Schubanstieg selber ein Schub von über 2o dyn/cm erreicht wird, werden diese ganzen Proteinmoleküle aber wieder herausgedrückt,

Durch dieses Experiment wird auch gezeigt, dass eine starke Entknäuelung erst auftritt bei der, durch die Flächenexpansion ermöglichten, Penetration der ganzen Proteinmoleküle, dass also durch die Adsorption bei konstanter Fläche die Proteinmoleküle höchstens schwach denaturiert werden.

Mit Hilfe der Penetration bei konstantem Schub ist es möglich, Lipid-Protein-Strukturen herzustellen, die einer Hälfte des Membranmodells von Lenard (1966;vergl. Abb.1) entsprechen. Dadurch dass die Penetration erst nach beendeter Adsorption erfolgt, erhält man vermutlich eine ziemlich gleichmässige Struktur (Abb.14). Durch vorzeitiges Abbrechen der Flächenexpansion kann man ohne weiteres Strukturen erhalten, bei denen der Lipidanteil im Film grösser ist als in Abb.14.

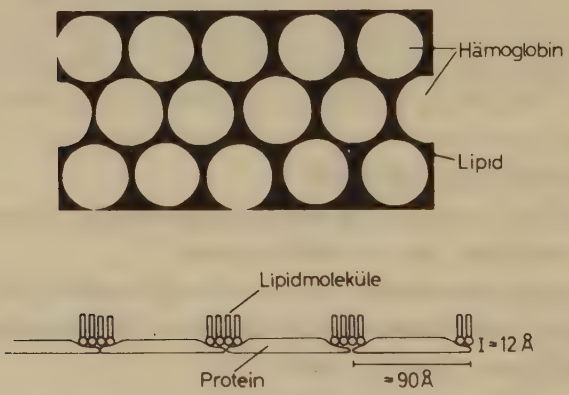


Abb.14 Schema einer Lipid-Protein-Struktur, die man erhält durch Penetration von Hämoglobin in einen Arachinsäurefilm bei konstantem Schub. Die angegebenen Masse entsprechen dem in Abb.13 wiedergegebenen Experiment (3.10^{12} Moleküle/cm^2; 10 dyn/cm). Durch vorzeitiges Abbrechen der Expansion können auch Strukturen hergestellt werden, bei denen der Lipidanteil im Film grösser ist.

5. Struktur der adsorbierten Proteinschicht

a) Dicke

Die Lichtdurchlässigkeit eines dünnen nicht absorbierenden Dielektrikums hängt wegen Interferenz von seiner Dicke ab. Dampft man auf ein Gläschen eine dünne Aluminiumschicht, deren Lichtdurchlässigkeit 3o % beträgt, und zieht darüber Cd-Arachidatfilme (vergl. § 8b), so steigt die Transmission bei 65o nm an, solange nicht mehr als 25 Cd-Arachidatschichten aufeinanderliegen (Drexhage 1966).

Zur Messung der Dicke der adsorbierten Proteinschicht wird eine Arachinsäure-Protein-Doppelschicht über ein Dielektrikum von 13 Arachidatschichten auf der Aluminiumunterlage gezogen. Die Erhöhung der Transmission, die durch diese Dickenänderung des Dielektrikums entsteht, ist bei 65o nm mit einer

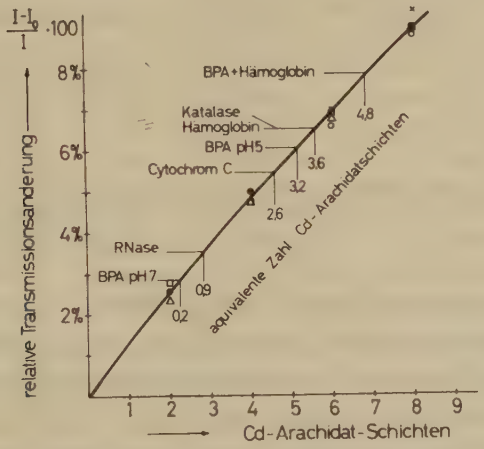


Abb.15 Transmissionsänderung eines 3o% durchlässigen Aluminiumspiegels, bedeckt mit 13 Cd-Arachidatschichten, beim Vergrössern der Dicke des Dielektrikums mit weiteren Cd-Arachidatschichten (Eichkurve). Daneben sind die Transmissionsänderungen eingezeichnet, die beim Aufziehen von Arachinsäure-Protein-Doppelschichten gemessen werden. Aus dem Diagramm kann man die Dicke einer Proteindoppelschicht in Vielfachen einer Cd-Arachidatschicht (26,4 Å) ablesen. (BPA = Rinderplasmaalbumin)

solchen Unterlage am grössten (vergl. Drexhage 1966). Diese Transmissionsänderung wird verglichen mit einer Eichkurve, die man erhält durch Transmissionsmessung nach Aufziehen von 2, 4, 6 und 8 Cd-Arachidatschichten auf dieselbe Unterlage (Abb.15). Aus der Eichkurve liest man die einer Proteinschicht entsprechende Anzahl von Cd-Arachidatschichten ab. Eine Arachidatschicht ist 26,4 Å dick (Wiegand 1968). Vernachlässigt man den veränderten Brechungsindex und einen evtl. an der Protein-Lipid-Grenze vorhandenen Phasensprung, so erhält man als Dicke der Proteinschichten (Adsorptionszeit 3o min, c = o,12 g/lit) die in Tab.2 angegebenen Werte. Zum Vergleich sind in Tab.2 verschiedene Literaturangaben über die Grösse der Proteinmoleküle angegeben.

Protein	Dicke		Grösse der Proteinmoleküle
Hämoglobin pH 7	1,8 Ar.s.	47,5 Å	64x55x5o Å (Perutz 1962)
BPA pH 7	o,1 Ar.s.	2,6 Å	7o Å (Tanford 1963)
BPA pH 5	1,6 Ar.s.	42,o Å	
Ribonuclease pH 7	o,5 Ar.s.	13,o Å	38x28x22 Å (Kartha 1967)
Katalase pH 5	1,8 Ar.s.	47,5 Å	1oo Å (Tanford 1963)
Cytochrom C pH 7	2,6 Ar.s.	34,o Å	

Tabelle 2 Dicken von adsorbierten Proteinschichten verglichen mit der Grösse der Proteinmoleküle. (BPA = Rinderplasmaalbumin)

Die Dicke einer Hämoglobinschicht entspricht gut einem Moleküldurchmesser und bestätigt die Folgerung aus der optischen Absorptionsmessung, dass nur eine Proteinschicht adsorbiert wird. Das Resultat bei Plasmaalbumin zeigt, dass bei pH 5 etwa eine halbe bis eine Molekülschicht adsorbiert wird. Das hängt davon ab, ob das Molekül stark ellipsoid gebaut ist; denn die in Tab.2 angegebenen 7o Å sind ein mittlerer Moleküldurchmesser. Der Einfluss der elektrischen Ladung auf die Adsorption von Plasmaalbumin ist gleich wie bei Hämoglobin: Bei gleicher Ladung von Film (pK=5,6; Pethica 1956) und Protein (i.P.4,9) bei pH 7 erfolgt die Adsorption nur langsam.

b) Enzymatische Aktivität

Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität adsorbierter Proteine gibt die Möglichkeit, etwas Genaueres über die Veränderung ihrer Struktur bei der Adsorption an die polaren Lipidgruppen auszusagen.
Da auf der Filmfläche nur wenige Enzymmoleküle Platz haben, werden solche mit hoher Wechselzahl verwendet, bei denen ausserdem der Aktivitätstest einfach durchzuführen ist.

Katalase

Das Enzym wird auf übliche Weise an Arachinsäure adsorbiert (o,4 g/lit, 3o min, pH 5, 25°C). Die Dicke der adsorbierten Katalaseschicht beträgt nach Tab.2 ca. 47 Å. Durch Vergleich mit dem Durchmesser des Moleküls von ca. 1oo Å (Tab.2) folgt, dass sicher nicht mehr als eine Molekülschicht adsorbiert ist. Zur Aktivitätsbestimmung wird nur beim Eintauchen eines Gläschens eine Lipid-Protein-Schicht aufgezogen. Vor dem Austauchen wird der restliche Film entfernt.(Das Gläschen ist beim Austauchen völlig trocken.)
Taucht man dieses Gläschen, das etwa eine Oberfläche gemäss Abb. 8 besitzt, in eine Küvette mit einer o,3 prozentigen H_2O_2-Lösung ein, so entwickeln sich auf der vom Lipid-Protein-Film bedeckten Hälfte des Gläschens kleine Blasen (Abb.16). Bei höherer H_2O_2-Konzentration lösen sich die Blasen ab,und der Sauerstoff perlt nach oben. Die Gasentwicklung dauert lange an. Zieht man nach 1o Minuten das Gläschen heraus, stoppt die Reaktion in der Küvette nahezu, allerdings nicht vollständig. Es entstehen noch kleine Bläschen in der Lösung. Kleine Mengen des Enzyms haben sich also vom Gläschen abgelöst. Adsorbiert man die Katalase an einen fluoreszierenden Farbstoffilm (Abb.17), zieht diesen auf und lässt wie oben die Reaktion ablaufen, so bemerkt man manchmal, dass das vor der Reaktion beim Bestrahlen mit UV gleichmässig blau leuchtende Plättchen nach längerer Reaktion dunkle Flecken zeigt. Die

Katalase kann mitsamt ihrer Lipidunterlage vom Gläschen abgelöst werden.

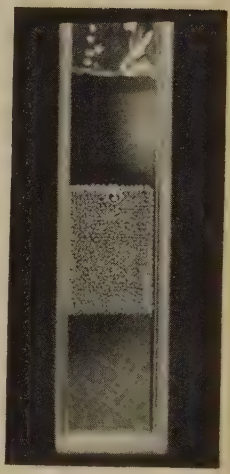
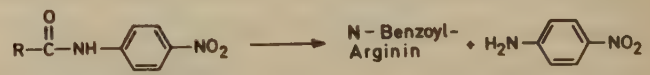


Abb.16 H_2O_2-Zersetzung durch Katalase, die an einen Arachinsäurefilm adsorbiert ist. Die Enzymmoleküle wurden vor dem Aufziehn an einen Arachinsäurefilm auf der Wasseroberfläche adsorbiert und von der Enzymlösung durch Verschieben über drei Schleusen hinweg abgetrennt. Die Aufnahme wurde 1 Minute nach Eintauchen des Enzyms in die o,o3%ige H_2O_2-Lösung gemacht. Aus der Zahl der Bläschen pro cm^2 errechnet man eine O_2-Produktion von ca. $6 \cdot 10^{-7}$ Mol/$cm^2 \cdot min$ = 12int. Einheit. (Bergmeyer 1962). Das verwendete Enzympräparat (§8a) enthält 39'ooo Einheiten/mg. Mit dem MG 24o'ooo (Weber 1967) schätzt man damit ab, dass ca. $7 \cdot 10^{10}$ Katalasemoleküle pro cm^2 vollaktiv sind. Durch Vergleich der Dicke der Proteinschicht mit der Grösse des Moleküls (Tab.2) schätzt man ab, das etwa 1/3 Schicht, d.h. ca. $5 \cdot 10^{11}$ Moleküle adsorbiert sind. Im Mittel ist also 1/7 der adsorbierten Katalasemoleküle vollaktiv, oder, da jedes Molekül vier aktive Zentren besitzt (Weber 1967), bei jedem zweiten adsorbierten Katalasemolekül ist noch ein aktives Zentrum voll funktionsfähig.

Trypsin

Das Trypsin wird wie die Katalase adsorbiert und aufgezogen. Als Test für die enzymatische Aktivität wird die Reaktion gemäss Formel I verwendet.

Formel I



N-Benzoyl-DL-Arginin-4-nitranilid

Das Gläschen mit dem Arachinsäure-Trypsin-Film wird in eine Küvette mit dem Substrat (vergl. § 8a) gesteckt, und die Extinktionszunahme bei 4o5 nm (bewirkt durch die langwellige Verschiebung einer Absorptionsbande von 31o auf 325 nm; vergl. Formel I) wird in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Bei einer Substratkonzentration von $1o^{-3}$ Mol/lit misst man eine Extinktionszunahme von o,oo5 pro Minute. Das entspricht einer Aktivität von etwa $1o^{9}$ vollaktiven Trypsinmolekülen pro cm^2 (vergl. § 8a). Ein Vergleich mit der wirklich adsorbierten Molekülzahl ist nicht möglich, da die Trypsin-Lipid-Filme so viskos sind, dass sie sich nur schlecht und nicht reproduzierbar aufziehen lassen. (Dasselbe gilt auch für Malatdehydrogenase.) Daher kann nicht entschieden werden, ob nur so wenige Moleküle adsorbiert sind, oder ob ein Teil der adsorbierten Moleküle nicht mehr enzymatisch aktiv ist. Zieht man das Gläschen nach 1o Minuten heraus, so hört die Reaktion in der Küvette nicht auf, sondern geht mit etwa der halben Geschwindigkeit weiter. Mit Hilfe der Adsorption an einen fluoreszierenden Farbstoffilm kann man wie bei Katalase zeigen, dass sich das Enzym z.T. mitsamt der Lipidunterlage abgelöst hat.

Malatdehydrogenase

Die gleicheMethode wie bei Trypsin kann man auch auf dieses Enzym aus dem Citronensäurezyklus anwenden. Bei der Adsorption von Malatdehydrogenase an Arachinsäure oder Stearinsäuremethylester wird der Lipid-Protein-Film auch so viskos, dass man den Film nicht mehr gleichmässig aufziehen kann. Als Test für die Enzymaktivität dient die Reaktion

$$\text{Oxalessigsäure} + \text{NADH} + H^+ \longrightarrow \text{Aepfelsäure} + NAD^+$$

Mit einem eingetauchten Plättchen misst man die Abnahme der Extinktion von NADH bei 34o nm. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 1o^{-4}$ Mol/lit NADH und $1,1 \cdot 1o^{-3}$ Mol/lit Oxalacetat stellt man eine Extinktionsänderung von o,o5 pro Minute fest. Das entspricht etwa $1o^{1o}$ vollaktiven Enzymmolekülen pro cm^2.

Im übrigen gilt dasselbe wie für Trypsin. Auf jeden Fall ist nachgewiesen, dass die Malatdehydrogenasemoleküle zum Teil bei der Adsorption an den Lipidfilm soweit ihre Tertiärstruktur behalten, dass die beiden aktiven Zentren noch funktionsfähig bleiben.

6. Proteine in organisierten Systemen

Die bisher beschriebenen Versuche können verwendet werden, um ganz unabhängig von der Natur kompliziertere organisierte Molekülanordnungen zu bauen. Früher wurde gezeigt (Kuhn 1967), dass man mit der Methode von Blodgett (1935) gezielt Systeme aus lipidartigen Farbstoffen aufbauen kann, die in einer Dimension geordnet sind. Als Nachweis für die Ordnung diente dabei die Fluoreszenz und Fluoreszenzlöschung durch Energieübergang. Es wird nun gezeigt, dass man auch Proteine in derartige Systeme einbauen kann.

a) Energieübergang auf Hämoglobin

Methämoglobin besitzt eine Absorptionsbande bei 4o6 nm (Abb.17). Ein benachbartes Farbstoffmolekül, das ungefähr bei dieser Wellenlänge fluoresziert, kann seine Anregungsenergie strahlungslos an die Hämgruppen des Hämoglobins abgeben. Als Sensibilisator wird ein Cyaninfarbstoff (Formel II in Abb.17) verwendet, dessen Fluoreszenzspektrum in Abb.17 wiedergegeben ist.

Durch Aufziehen eines Arachinsäure-Hämoglobin-Doppelfilms, sowie von reinen Arachinsäurefilmen und eines Mischfilms Farbstoff II: Arachinsäure wie 1:1o, kann man versuchen, einen Schichtaufbau gemäss Abb.18 herzustellen. Bestrahlt man eine solche Anordnung mit UV-Licht, so fluoreszieren die drei Zonen von Abb.18 wie in Abb.19 sichtbar.

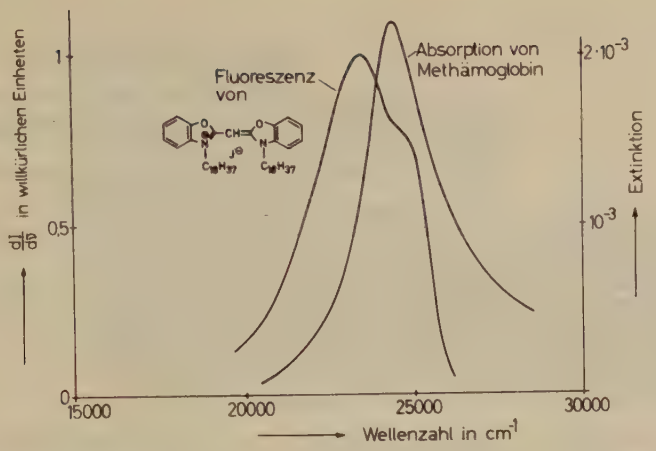


Abb.17 und Formel II Absorptionsspektrum einer Doppelschicht von adsorbiertem Methämoglobin. Aufgetragen ist die Extinktion gegen die Wellenzahl. Daneben ist das Fluoreszenzspektrum einer monomolekularen Mischschicht aus dem Cyaninfarbstoff mit der Formel II und Arachinsäure im Verhältnis 1:1o (Tillmann 1966) eingezeichnet. In willkürlichen Einheiten ist $dI/d\nu$ gegen die Wellenzahl aufgetragen (I = Fluoreszenzintensität, I_o = Fluoreszenzintensität ohne Akzeptor, ν = Wellenzahl).

Die Löschung der Fluoreszenzintensität eines Sensibilisators durch Energieübergang auf eine ebene Akzeptorschicht hängt vom gegenseitigen Abstand nach Gl.15 ab.(Perrin 1935, Förster 1945, Kuhn 1967)

Gl.15 $$\frac{I}{I_o} = \left[1 + \left(\frac{d_o}{d}\right)^4\right]^{-1}$$

Dabei ist I_o die Fluoreszenzintensität ohne Akzeptor, d der Abstand des Sensibilisators von der Akzeptorschicht und d_o ein Parameter, der von der räumlichen Anordnung und von den inneren Eigenschaften der Chromophore gemäss Gl.16 abhängt.

Gl.16 $$d_o = \alpha \cdot \lambda_s \cdot q_s^{1/4} \cdot E_{AS}^{1/4}$$

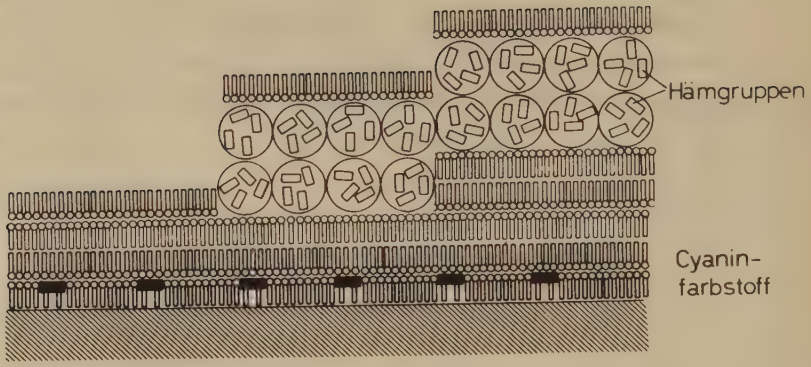


Abb.18 Schichtaufbau zum Nachweis des Energieübergangs von einem Cyaninfarbstoff (Formel II) auf Hämoglobin.

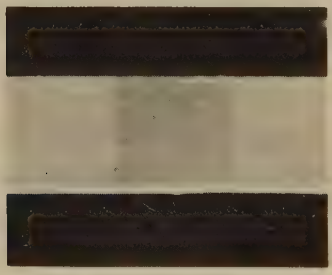


Abb.19 Fluoreszenz eines Gläschens mit einer Schichtanordnung gemäss Abb.18. In der mittleren Zone, wo das Hämoglobin nahe der Farbstoffschicht liegt, wird die Fluoreszenz stark gelöscht. Aus der gleichmässig gelöschten Fluoreszenz wird unmittelbar deutlich, dass die Hämoglobinmoleküle eine gleichmässige Schicht bilden. (Die auf der Photographie sichtbaren waagrechten Streifen sind Reflexe des Lichts an den Gläschenrändern.) Die Fluoreszenz der rechten Zone, wo das Hämoglobin weit vom Sensibilisator entfernt ist, wird nur wenig geschwächt.

Der Faktor α beträgt bei Ausrichtung der Sensibilisatorübergangsmomente in der Schichtebene und bei statistischer Anordnung der Akzeptorübergangsmomente o,14 (Kuhn 1967). λ_s ist die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums. q_s ist die Fluoreszenzquantenausbeute des Sensibilisators, die beim Farbstoff mit der Struktur von Formel II o,43 beträgt (Tillmann 1966). E_{AS} berechnet man nach Gl.17.

Gl.17 $$E_{AS} = \int f_s(\bar{\nu}) E_A(\bar{\nu}) (\frac{\bar{\nu}_s}{\bar{\nu}})^4 d\bar{\nu} \quad \text{wobei} \quad \int f(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = 1$$

$f(\bar{\nu})$ ist die spektrale Verteilung der Fluoreszenzintensität, $E_A(\bar{\nu})$ ist die Extinktion der Akzeptorschicht in Abhängigkeit von der Wellenzahl $\bar{\nu}$. Durch graphische Integration nach Gl.17 mit Hilfe von Abb.17 erhält man $E_{AS} \approx 1o^{-3}$. Damit kann man den Parameter d_o nach Gl.16 berechnen zu

$$d_o = o,14 \cdot 42oo \cdot o,81 \cdot o,178 = 85 \text{ Å} .$$

Die Hämoglobinchromophore haben nicht alle denselben Abstand von der Farbstoffschicht. Um einen mittleren effektiven Abstand zu erhalten, wird vereinfachend angenommen, dass die Chromophore homogen in der Hämoglobinschicht verteilt sind, dass also Gl.18 gilt. Darin bedeutet x den Abstand von der

Gl.18 $$E_{AS} = \int_{d_1}^{d_2} e_{AS}\, dx = (d_2 - d_1) e_{AS}$$

Farbstoffschicht. d_2 und d_1 sind die Abstände, zwischen denen die Hämoglobinschicht liegt. Da die durch Energieübergang absorbierte Leistung (L_a) einer Akzeptorschicht der Gl.19 gehorcht (Kuhn 1967), gilt für die im Abstandselement dx

Gl.19 $$L_a = (\frac{d_o}{d})^4 L_e \qquad L_e = \text{emittierte Leistung}$$

absorbierte Leistung, bei Verwendung von Gl.16, die Gl.2o. Durch Integration von Gl.2o zwischen d_2 und d_1 und Berücksichtigung von Gl.18 erhält man Gl.21.

Gl.2o $$dL_a = L_e \frac{(\alpha \lambda_s q^{1/4})^4 e_{as}}{x^4} \, dx$$

Gl.21 $$\frac{L_a}{L_e} = (\alpha \lambda_s q^{1/4} E_{AS}^{1/4})^4 \cdot \frac{1}{3}\left(\frac{1}{d_1^3} - \frac{1}{d_2^3}\right)\frac{1}{d_2 - d_1}$$

Durch Vergleich von Gl.21 mit Gl.19 erkennt man, dass für die angenommene homogene Akzeptorschicht zwischen d_2 und d_1 ein effektiver Abstand d_{eff} nach Gl.22 verwendet werden kann.

Gl.22 $$\frac{1}{d_{eff}^4} = \frac{1}{3}\left(\frac{1}{d_1^3} - \frac{1}{d_2^3}\right)\frac{1}{d_2 - d_1}$$

Für die beiden in Abb.18 gezeigten Anordnungen mit zwei bzw. vier Arachinsäurezwischenschichten, sowie für drei und fünf Zwischenschichten sind in Abb.2o die gemessenen Fluoreszenzintensitäten I/I_o gegen die nach Gl.22 für diese Anordnungen berechneten d_{eff}-Werte aufgetragen. Als Dicke einer Arachinsäureschicht wird 26,4 Å (Wiegand 1968) verwendet. Gleichzeitig ist in Abb. 2o das theoretische Abstandsgesetz (Gl.15) für Energieübergang mit dem Seite 33 berechneten d_o von 85 Å eingezeichnet.

b) Mehrfache Proteinschichten

Durch das Verschieben eines Lipidfilms über verschiedene Tröge ist es möglich, nacheinander zwei verschiedene Proteine an denselben Film zu adsorbieren. Man kann z.B. Plasmaalbumin bei pH 5 an einen Arachinsäurefilm adsorbieren. Zur Dickenbestimmung zieht man, wie beschrieben, eine Filmprobe auf (Abb.15). Danach verschiebt man den übrigen Lipid-Protein-Film über ein weiteres Becken und adsorbiert bei pH 7 Hämoglobin. Aus diesem Film zieht man eine Probe zur Dickenmessung (Abb.15) und eine zur Absorptionsmessung heraus.

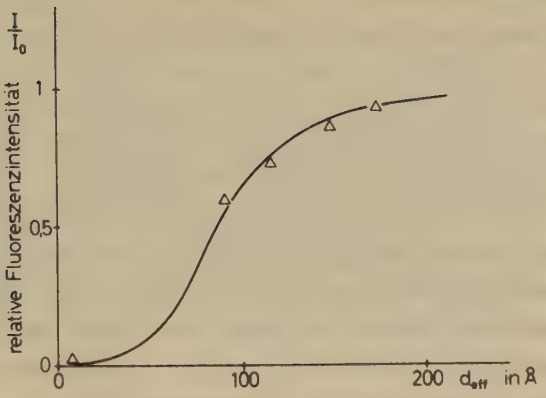


Abb.2o Abstandsabhängigkeit des Energieübergangs von einem Cyaninfarbstoff (Formel II) auf Hämoglobin. Aufgetragen ist die relative Fluoreszenzintensität I/I_o gegen den effektiven Abstand (Gl.22) von Sensibilisator-und Akzeptorschicht. Beim untersten Messpunkt ist nur eine Hämoglobinschicht in direktem Kontakt mit der Farbstoffschicht. Da der Energieübergang bei zunehmendem Abstand rasch abfällt, spielt dies keine Rolle. Aus der befriedigenden Uebereinstimmung der Messpunkte mit der theoretisch berechneten Kurve ist ersichtlich, dass es sich hierbei um Förster'schen Energieübergang handelt, und dass es tatsächlich möglich ist, Hämoglobinmoleküle gezielt an eine bestimmte Stelle in einem eindimensional geordneten Molekülaufbau zu bringen.

Man erhält dabei folgende Resultate:

Dicke der Plasmaalbuminschicht	42 Å
Dicke der Plasmaalbumin/Hämoglobin-Schicht	64 Å
Dicke der Hämoglobinschicht allein	22 Å
Anzahl der Hämoglobinmoleküle pro cm^2 aus der Absorptionsmessung	$2{,}8 \cdot 10^{12}$

Aus der Dickemessung und aus der Absorptionsmessung folgt, dass zusätzlich zur Plasmaalbuminschicht noch eine halb-bis dreiviertel belegte Hämoglobinschicht adsorbiert wird. Ob eine echte Doppel-

schicht (Abb.21) entstanden ist, oder ob sich die Hämoglobinmoleküle in Lücken der Plasmaalbuminschicht gedrängt haben (vergl. Seite 26) (Abb.21), oder ob eine Kombination von beidem entstanden ist, kann aus den Dickebestimmungen nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Dazu müsste man die adsorbierte Plasmaalbuminmenge genau durch Extinktionsmessung kennen.
In jedem Fall ist beachtenswert, dass an den Plasmaalbumin-Lipid-Film, an den sich keine weiteren Plasmaalbuminmoleküle mehr anlagern können, ohne weiteres ein anderes Protein adsorbiert wird. Das wird vermutlich ermöglicht durch den unterschiedlichen Ladungszustand der beiden Proteine (isoelektrischer Punkt von Plasmaalbumin 4,9 , von Hämoglobin 6,9).

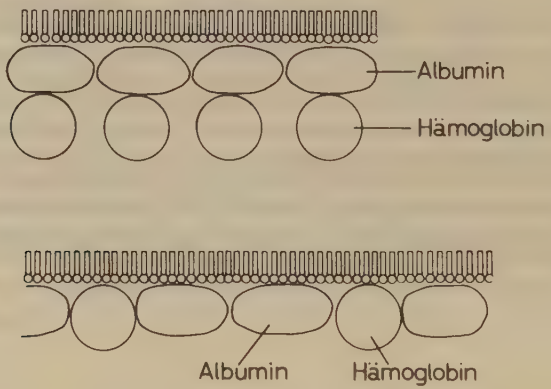


Abb.21 Mögliche Anordnungen, die bei der aufeinanderfolgenden Adsorption von Plasmaalbumin (bei pH 5) und Hämoglobin (bei pH 7) an denselben Arachinsäurefilm entstehen.

Auf einem festen Träger kann man mit Hilfe der Aufziehtechnik aus verschiedenen Lipid-Protein-Filmen kompliziertere, eindimensional geordnete Systeme aufbauen. Zur Kontrolle der Anordnung kann der Energieübergang dienen. Versucht man z.B., einen Schichtaufbau gemäss Abb.22 herzustellen, so erhält man beim Bestrahlen des Plättchens mit UV-Licht eine Fluoreszenz-

helligkeit gemäss Abb.23, in welcher zum Vergleich ein Gläschen mit der Anordnung von Abb.18 mit abgebildet ist. Man sieht, dass die Plasmaalbuminschicht dazu führt, dass die Fluoreszenzlöschung durch Energieübergang vom Cyaninfarbstoff (Formel II) auf das Hämoglobin kleiner ist, als bei der mittleren Schicht des Vergleichsgläschens, wo die Plasmaalbuminschicht fehlt, im übrigen aber die Anordnung gleich ist.
Damit ist gezeigt, dass tatsächlich die angestrebte eindimensional organisierte Anordnung von Abb.22 vorliegt.

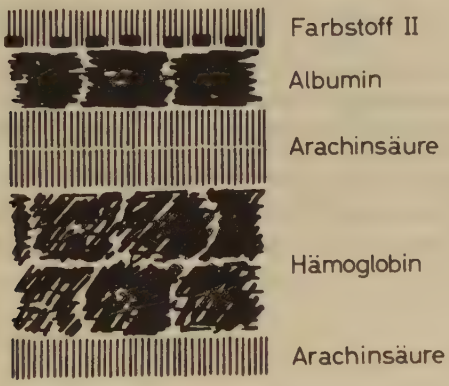


Abb.22 Schematische Zeichnung für einen eindimensional organisierten Aufbau aus verschiedenen Lipiden und Proteinen. Die doppelte Arachinsäure-Hämoglobin-Schicht wird wie üblich hergestellt. Ein Arachinsäure-Plasmaalbumin-Film wird beim nochmaligen Eintauchen des Gläschens darübergezogen. Nach Entfernen dieses Films von der Wasseroberfläche wird ein Mischfilm aus Arachinsäure und Cyaninfarbstoff (Formel II) (1o:1) gespreitet und beim Austauchen des Gläschens aufgezogen.

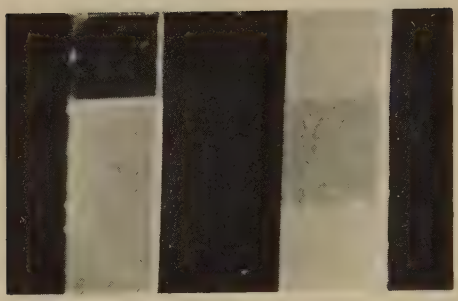


Abb.23 Fluoreszenz eines Gläschens mit der Schichtanordnung von Abb.22 beim Bestrahlen mit UV-Licht. Als Vergleich dient ein Gläschen mit der Anordnung von Abb.18. Man kann erkennen, dass die Fluoreszenzlöschung des Cyaninfarbstoffs durch Energieübergang auf Hämoglobin geringer ist als bei der mittleren Schicht des Vergleichsgläschens, wo die Plasmaalbuminschicht fehlt, im übrigen aber die Anordnung gleich ist. Die Fluoreszenzlöschung ist aber stärker als im oberen Drittel des Vergleichsgläschens. Man kann also abschätzen, dass die Plasmaalbuminschicht dünner als zwei Arachinsäureschichten ist. Dies entspricht dem Ergebnis der direkten Dickemessung (Tab. 2).

7. Wichtigste Ergebnisse, offene Probleme

Durch die Technik, einen Lipidfilm unverletzt über verschiedene Substrate zu transportieren, wurden gegenüber früheren Verfahren für die Adsorption von Proteinen an Lipidfilme (vergl. Colaccico 1967) folgende Verbesserungen erzielt:

1. Der Lipidfilm kann auf einer sauberen Wasseroberfläche gespreitet werden (gegenüber der Methode von Alexander (1963), der auf einer Proteinlösung spreitete).

2. Der Lipidfilm wird nicht durch Wirbel verletzt, die beim Einspritzen von Proteinlösung unter einen vorher hergestellten

Film entstehen. (Vergleiche die Methode von Schulman 1949.)
3. Der Film liegt über einer homogenen Proteinlösung und man erhält damit einen über die gesamte Fläche gleichmässigen Lipid-Protein-Film (dies im Gegensatz zur Methode von Eley 1956, der Proteinlösung an einer Stelle durch den Film hindurch ins Wasser einspritzte).
4. Die Adsorption und das Eindringen des Proteins in den Film können durch Schubmessung überwacht werden (im Gegensatz zur Adsorption an einen vorher auf einen Träger aufgezogenen Lipidfilm, wobei die Lipidschicht abgelöst werden kann (Sobotka 1955)).
5. Der fertige Lipid-Protein-Film kann vom gelösten Protein abgetrennt werden. Dadurch kann die Penetration unabhängig vom Adsorptionsvorgang untersucht werden.
6. Durch die Kombination dieser Isolierungstechnik des freien Lipid-Protein-Films mit der Aufziehtechnik auf einen Träger wird es erstmals möglich, die eigentliche Adsorption eines Proteins an einen Lipidfilm quantitativ zu untersuchen. Weiterhin wird es damit möglich, aus den kontrolliert hergestellten Lipid-Protein-Filmen mehrfache Schichten aus verschiedenartigen Lipiden und Proteinen aufzubauen.

Diese Methode wurde exemplarisch auf Hämoglobin und einige Enzyme (z.B. Katalase), sowie auf einige Lipidfilme (besonders Arachinsäure und Stearinsäuremethylester) angewendet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt, deren Verallgemeinerung auf beliebige Proteine und Lipidfilme allerdings zu überprüfen ist:
1. Bei der Adsorption der verwendeten Proteine an beliebige Lipidfilme wurde nicht mehr als eine Proteinschicht angelagert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Eley 1956, 1957. Er verfolgte die Abhängigkeit des Schubanstieges von der durch den Film eingespritzten Proteinmenge. Er erhielt dabei eine der Abb.1c ähnliche Funktion. Aus zwei Knickpunkten in dieser

Kurve schloss er auf drei übereinandergelagerte Proteinschichten, von denen die erste völlig entknäuelt adsorbiert sein sollte. Eine derartige Abhängigkeit des Schubanstiegs von der adsorbierten Proteinmenge (allerdings ohne Knickpunkte) lässt sich zwanglos durch die Adsorption einer Proteinschicht mit geringer Penetration erklären (vergl. Seite 18).

2. Bei kleinem Schub (ca. $<$ 15 dyn/cm) können adsorbierte Proteine ganz in den Lipidfilm eindringen und, falls der Schub konstant gehalten wird, sich dabei entknäueln. Dies bestätigt eine Vermutung von Schulman 1956, dass bei einem Schub, der kleiner ist als der Kollapsschub von Proteinfilmen (ca. 15 dyn/cm), Proteinmoleküle ganz in einen Film eindringen können.

3. Bei hohem Schub des Lipidfilms dringen nur kleine Teile der adsorbierten Proteinmoleküle (Kettensegmente, Aminosäurereste) in den Film ein. Die Auflösung der Tertiärstruktur ist dabei gering.

4. Für die Adsorption ist eine Penetration des Proteins in den Lipidfilm nicht notwendig. Beeinflusst wird die Adsorption durch elektrostatische Kräfte zwischen Lipidfilm und Proteinmolekül und zwischen verschiedenen Proteinmolekülen. Bezüglich des Einflusses von polaren Filmgruppen ist die geringe Adsorption an Kephalin und Stearylalkohol bemerkenswert.

5. Direkt am Lipidfilm adsorbierte Enzyme sind noch katalytisch wirksam. Dieses Ergebnis ist zu vergleichen mit Experimenten von Kaplan 1955 und Fraser 1956, die Katalase und Trypsin an lipidstabilisierte Oel/Wasser-Emulsionströpfchen adsorbierten und dabei nur enzymatische Aktivität feststellten, wenn die Proteine, wie sie annahmen, als Mehrfachschichten adsorbiert wurden, wobei die ersten Schichten denaturiert sein sollten.

6. Für den Vorgang der Penetration wurde ein theoretischer Ansatz angegeben. Die aus diesem abgeleiteten Zusammenhänge wurden durch die Experimente bestätigt.

7. Es wurde gezeigt, dass Energiewanderung von angeregten organischen Farbstoffmolekülen auf Proteine mit einem Coenzym als Akzeptor möglich ist, und dass diese Energiewanderung dem Ab-

standsgesetz eines Förster-Mechanismus gehorcht.
8. Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, Proteine gezielt an eine bestimmte Stelle in eindimensional geordneten Strukturen aus Lipid und Protein einzubauen. Dies ist eine Weiterentwicklung der von Kuhn 1967 für verschiedenartige Lipide verwendeten Methode.

Wenn auch über die genaue molekulare Art der Wechselwirkung zwischen Protein- und Lipidatomen mit Hilfe dieser makroskopischen Experimente wenig ausgesagt werden kann, sind doch die Ergebnisse der Adsorptions- und Penetrationsexperimente möglicherweise hilfreich beim Entwurf von Modellen natürlicher Membranstrukturen. Interessant ist in dieser Hinsicht die geringe Adsorptionsfähigkeit von Protein an Kephalin und OH-Gruppen; auch die katalytische Aktivität adsorbierter Enzyme ist hier zu erwähnen. Ausserdem wurden unter kontrollierten Bedingungen Strukturen gebaut, die der Hälfte von oft postulierten Membranstrukturen entsprechen. Eine Anordnung, bei der eine völlig entknäuelte Proteinschicht direkt am Lipidfilm adsorbiert ist, die also einer oft gezeichneten Form des Danielli-Modells (vergl. Abb. 1) entspricht, konnte nicht festgestellt werden. Die Möglichkeit, Proteine und Lipide in organisierte Systeme einzubauen und die Ordnung mit Hilfe des Energieübergangs zu kontrollieren, sowie die Energieübergangsexperimente selber, stützen die Vermutung, dass es möglich sein wird, künstliche Strukturen zu bauen, die Aufschluss geben über den Mechanismus natürlicher hochorganisierter Systeme (z.B. Atmungskette, Photosyntheseapparat, Sehprozess).

Da die Experimente nur exemplarisch angelegt wurden, bleiben noch viele Probleme offen, auf die die beschriebenen Methoden angewendet werden können:
Durch genauere Ueberprüfung der Penetrationstheorie können die Aussagen über die eindringfähigen Gruppen präzisiert werden. Zur Verallgemeinerung dieser, sowie vieler anderer Ergebnisse,

ist es notwendig, auch Proteine zu untersuchen, die kein farbiges Coenzym besitzen. Hierzu muss man die optische Absorption bei 280 nm mit der nötigen Empfindlichkeit messen können, was bisher nicht möglich war. Dies ist auch erforderlich, um die Aktivität adsorbierter Enzyme quantitativ beurteilen zu können. Interessant wäre dann die Untersuchung einer durch zwei verschiedene adsorbierte Enzyme katalysierten Folgereaktion. Um etwas über die molekulare Anordnung in der Filmebene der adsorbierten bzw. ganz penetrierten Proteine zu erfahren, wären elektronenmikroskopische Aufnahmen günstig, ähnlich wie sie von Brüning 1969 und von v.Elsner 1969 von aufgezogenen Lipidfilmen gemacht wurden. Man kann ferner versuchen, aus definierten Lipid-Protein-Filmen bimolekulare Lipid-Protein-Membranen herzustellen. Weiter kann der Aufbau komplizierterer organisierter Systeme angestrebt werden, besonders mit Substanzen, die den erwähnten natürlichen organisierten Anordnungen besser entsprechen. Auch die spezifische Wechselwirkung von Antikörpern mit in den Film eingebauten Antigenen (Colaccico 1969) lässt sich mit der hier verwendeten Methode besser als bisher untersuchen.

8. Experimentelle Einzelheiten

a) Trog und Substanzen

Der Trog mit sechs Abteilungen ist aus einer 1,5 cm starken Teflonplatte drei Millimeter tief herausgedreht (Innendurchmesser 13 cm, Aussendurchmesser 27 cm). Dieser Teflontrog ist auf die eben gedrehte Fläche einer Grundplatte aus Aluminiumguss auf solche Weise festgepresst, dass sich das Teflon unbehindert thermisch ausdehnen kann (Abb.24 und 25).

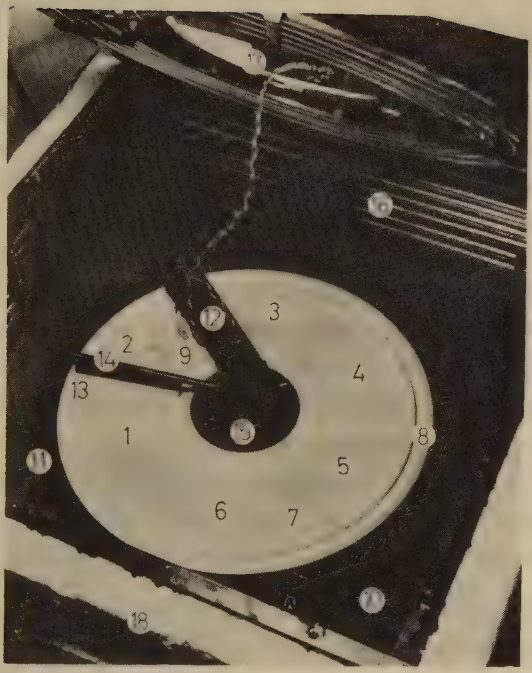


Abb.24 Innenansicht des temperierten Kastens mit dem ringförmigen Trog. Dieser ist 3 mm tief aus einer Teflonplatte herausgedreht. Die Zahlen auf dem Bild bezeichnen:

1, 2, 3, 4, 5, 6 Einzelne Becken mit 25 ml Inhalt
7 Trennwand 2,5 mm hoch (Teflon)
8 Ueberlaufrinne
9 Vertiefung zum Tauchen von Gläschen
1o Grundplatte aus Aluminiumguss
11 Halteklemmen für den Trog
12 Halterung für die Wilhelmywaage mit Messkopf (darunter sichtbar Filtrierpapier (15x12 mm) als Messplatte)
13 Barriere (Die zweite Barriere ist durch die Messkopfhalterung verdeckt.)
14 Mitnehmer für die Barriere
15 Getriebehalterung mit zwei konzentrischen Achsen
16 Kupferschlangen zur Temperierung
17 Decke mit Sichtfenster
18 Styroporisolierung

Die Trennwände sind in 3 mm breite Fugen im Trogboden eingelassen. Sie sind 1/2 mm niedriger als der Trogrand. Die beiden durch Messing beschwerten Teflonbarrieren haben die Form von schmalen Kreisringsegmenten. Sie liegen lose auf den Trogrändern auf und werden durch zwei Mitnehmer bewegt. Diese sind an zwei konzentrischen Achsen festgeklemmt. An der inneren Achse ist zudem die Halterung für die Wilhelmywaage befestigt. Die Anordnung der beiden Achsen ersieht man aus Abb.26. Die äussere Achse, und damit die durch sie bewegte Barriere, lässt sich unabhängig von der inneren drehen. Dabei wird die innere Achse, und damit die andere Barriere und die Wilhelmywaage , durch eine Magnetkupplung fixiert. Dadurch kann die Fläche zwischen den Barrieren verändert werden. Mit der zweiten Magnetkupplung (Abb.26) können beide Achsen miteinander verbunden werden. Nach Lösen der ersten Kupplung können so beide Barrieren und die Wilhelmywaage zusammen über den Trog verschoben werden.

Temperiert wird die Anordnung durch einen Thermostaten (Haake Mod.R2o). Die Badflüssigkeit strömt durch Kupferschlangen in

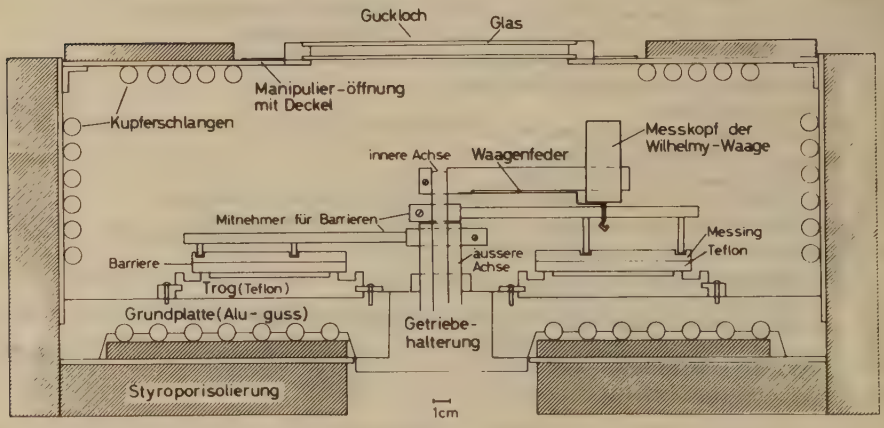


Abb.25 Querschnitt durch Trog und Gehäuse

der Grundplatte, an den Wänden und an der Decke, sowie zwischen den Glasscheiben des Sichtfensters. Das Auswechseln des Troginhalts, sowie andere Manipulationen (Spreiten, Schichtenaufziehen, pH-Messung) werden durch 2 cm grosse Löcher in der Decke über den einzelnen Becken ausgeführt. Diese Oeffnungen sind verschliessbar, so dass der Zutritt von Staub und die Veränderung der Temperatur vermieden werden (Abb.25).
Die Oberflächenspannung wird mit einer Wilhelmywaage gemessen. Diese besteht aus einem Filtrierpapier (15 mm breit, 12 mm hoch), das an einer Blattfeder aufgehängt ist (Bücher 1967). Die Auslenkung wird elektrisch gemessen. Auf einem Schreiber (Moseley 68o M) kann die Oberflächenspannung bzw. der Schub in dyn/cm registriert werden. Zur Messung der Fläche zwischen den

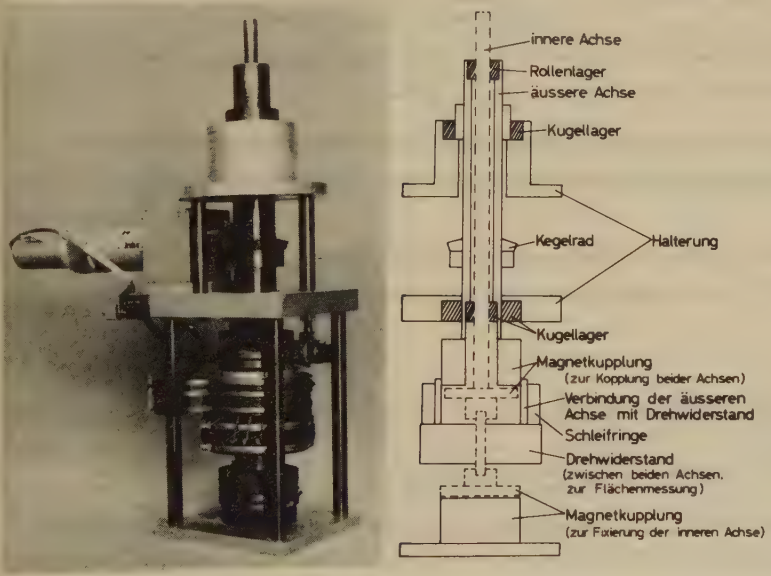


Abb.26 Getriebeeinsatz. Die oberste zapfenförmige Halterung wird durch die Mitte der Grundplatte gesteckt und von unten an diese festgeschraubt (vergl. Abb.25).

Barrieren dient ein zwischen die beiden Achsen geschaltetes Potentiometer. Die abgegriffene Spannung wird, in cm^2 geeicht, auf dem Schreiber abgelesen. Durch gleichzeitige Registrierung von Oberflächenspannung und Fläche auf einem X-Y-Schreiber kann man Schub-Flächen-Isothermen messen. Durch eine Rückkopplungsschaltung kann ein vorgewählter Schub konstant gehalten werden. Abweichungen vom Sollwert werden durch Aenderung der Fläche nachgeregelt. Stromversorgung, Messinstrumente und Regelung sind in einem Einschub vereinigt. *)

Die Filmsubstanzen wurden bezogen von:

Fluka AG Buchs,Schweiz : Arachinsäure, Stearinsäuremethylester, Stearylalkohol, Eicosan.

Mann Research Laboratories New York: L-α-Dipalmitoyl-Kephalin

Schuchardt GmbH München $H_{41}C_{20}NMe_3Br$

Von Herrn Dr. Sondermann (Physikal.Chem.Inst. Marburg) wurde der verwendete Cyaninfarbstoff (Formel II) hergestellt.

Die Lipide wurden in Chloroform (destilliert, über $Ba(OH)_2$ aufbewahrt) in einer Konzentration von etwa 10^{-3} Mol/lit gelöst.

Die Proteine wurden bezogen von:

Boehringer Mannheim: Katalase, Malatdehydrogenase, Trypsin, Ribonuclease, Lysozym, Cytochrom C

Calbiochem AG Luzern: Methämoglobin, Rinderplasmaalbumin

Die Proteine wurden in Wasser gelöst. Festsubstanzen und Lösungen wurden bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt.

---

*) Den Schaltplan dieser elektronischen Anlage verdanke ich Herrn Dipl.Ing. J.Pfau.

Die Enzymsubstrate wurden von Boehringer Mannheim bezogen:
Malatdehydrogenase-Testpackung, NADH, Oxalessigsäure, Trypsin-Testpackung
Zur Abschätzung der Enzymaktivitäten in § 5b wurden die Angaben zu den Packungen verwendet.

Der pH-Wert der Troglösungen wurde durch einen Veronalpuffer konstant gehalten. Dieser wurde folgendermassen hergestellt:
9,714 g Natriumacetat·3 H_2O + 14,724 g Veronalnatrium in 5oo ml Wasser.
1o ml dieser Stammlösung wurden für pH 5 mit 17,6 ml, für pH 7 mit 12 ml und für pH 9 mit o,8 ml o,2 normaler HCl versetzt und auf 5oo ml aufgefüllt.
Der pH-Wert wird mit einer Glaselektrode mit ebener Glasmembran (Ingold 4o3-31-M8) gemessen.

Das verwendete Wasser für die Proteinlösungen und den Puffer wurde zweimal destilliert, das erste Mal mit Kaliumpermanganat und Alkali.

b) Arbeitstechnik

Teflon ist so hydrophob, dass auch ohne Einparaffinieren des Trograndes die Lipidfilme ohne Verlust zwischen den Barrieren eingeschlossen und transportiert werden können. Obwohl die Trennwände der einzelnen Becken 1/2 mm niedriger sind als der Trogrand, können aus demselben Grund die einzelnen Becken unabhängig voneinander geleert werden. Da durch die Proteinlösung Trog und Barrieren hydrophil werden, muss man sie regelmässig durch Abreiben mit Methanol reinigen.

Herstellen des Lipid-Protein-Films

1) In Becken Nr.4 (Abb.24) sowie in die Schleuse Nr.3 wird mit einer 1o ml-Kolbenpipette 25 ml thermostatisierte Pufferlösung gefüllt. In den Becken Nr.1 und Nr.2 befindet sich destilliertes Wasser. Die Barrieren werden auf Becken Nr.2 zusammengeschoben, und dazwischen wird die Oberfläche durch Absaugen gereinigt.
2) Die Barrieren werden auf ca. 15o cm^2 (Nr.1+Nr.2) auseinandergefahren. Die Lipidlösung wird vorsichtig aufgetropft. Nach einer Minute wird der Film auf ca. 6o cm^2 und den gewünschten Schub komprimiert. Ueberschüssiger Film wird abgesaugt.
3) In Becken Nr.4 wird Proteinlösung pipettiert (meist ca. 1 bis 3 ml) und verrührt.
4) Die Barrieren werden gekoppelt. Der Film wird mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 cm/sec über die Schleuse auf Becken Nr.4 gefahren. Durch das Verschieben der Barrieren werden die Wasseroberflächen der Becken miteinander verbunden, so dass der Film ohne Schaden über die Wände transportiert wird. Durch die entstehenden Strömungen gelangt ein wenig Protein in Becken Nr.3 . Deshalb wird diese Schleuse leergesaugt.
5) Während der nun folgenden Adsorption wird (wie auch während des Verschiebens) die Oberflächenspannung dauernd kontrolliert.
6) Nach der Adsorptionszeit wird die Schleuse mit Wasser gefüllt, und der Film wird darüber hinweg auf Becken Nr.2 transportiert. Dabei wird am Film und an den Barrieren haftende Proteinlösung mitgeschleift. In die Schleuse gelangen etwa 1o Tropfen, nach Becken Nr.2 nur etwa ein Tropfen. *)

---

*) Verwey (1948) hat abgeschätzt, dass ein auf der Wasseroberfläche fliessender Film eine Wasserschicht von ca. $5 \cdot 1o^{-3}$ cm Dicke mitschleift. Würden alle Proteinmoleküle einer solchen Schicht mitverschoben, wäre die Lösung in Becken Nr.2 ca. 1oofach verdünnt. Man findet aber eine Verdünnung von etwa 1:1ooo, wobei diese Verunreinigung eher durch unregelmässige Strömungen hervorgerufen wird. Durch das Verschieben über die Schleuse und die zwei Trennwände wird die ursprüngliche Grenzschicht also weitgehend abgestreift.

Aufziehen des Films auf Gläschen (Bücher 1969)

Die Gläschen (Objektträger 12x38x1,2 mm) werden mit Ultraschall 2o min in heisser Ultraxlösung gereinigt und 2o min in Wasser mit Ultraschall abgespült. Darauf werden sie abgespritzt und mit einem Fön getrocknet. Diese hydrophilen Gläschen werden 15 min in Dimethylsilan hydrophobiert und 5 min in Methanol gebadet. Auf diese Unterlage werden immer 4 Cd-Arachidatschichten gezogen. Das Aufziehen dieser Filme,,sowie des verwendeten Farbstoffilms geschieht bei 3o dyn/cm in einem speziellen Trog.

Die Lipid-Protein-Filme werden in Becken Nr.2 aufgezogen (vergl. Abb.24). Das Gläschen wird in etwa zwei Minuten ein- und ausgetaucht. Dabei wird die Flächenabnahme des Films bei konstantem Schub (3o dyn/cm) auf dem Schreiber kontrolliert. Beim Austauchen befindet sich zwischen den beiden Lipid-Protein-Schichten eine gleichmässige Wasserschicht. Das Wasser verdunstet in etwa zwei Minuten. Zieht man bei 35°C auf, so tauchen die Gläschen völlig trocken aus. Das Aufziehen einer Doppelschicht gelingt mit den hauptsächlich verwendeten Substanzen (Hämoglobin, Stearinsäuremethylester, Arachinsäure) fast immer. Nach der Adsorption an Stearylalkohol und Kephalin zieht nur eine Schicht auf, die zweite unregelmässig. Bei Filmen mit Trypsin, Malatdehydrogenase, manchmal auch mit Plasmaalbumin, bricht der Film beim Aufziehen. Eine Messung der Viskosität zeigt, dass diese Filme fast doppelt so viskos sind wie entsprechende Filme mit Hämoglobin.

Absorptionsmessungen

Die Absorptionsspektren auf den Gläschen werden in einem speziellen Spektrometer (beschrieben bei Möbius 1969) gemessen. Um aus der gemessenen Absorption die Menge der adsorbierten Hämoglobinmoleküle zu erhalten, wurde aus einer Lösung des verwendeten Hämoglobins ein $\varepsilon_{max} = 2{,}1 \cdot 10^5$ lit/cm·Mol bestimmt.

Bei Havemann 1952 ist für Methämoglobin ein Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{max} = 6{,}24 \cdot 10^5$ lit/cm·Mol angegeben. Der Unterschied kann vielleicht darauf zurückzuführen sein, dass im Methämoglobin, das bei den beschriebenen Versuchen verwendet wurde, der Chromophor zum Teil zersetzt ist. Bei den Adsorptionsversuchen wurde der Extinktionskoeffizient der dafür verwendeten Methämoglobinlösung eingesetzt, da auch Moleküle mit evtl. verändertem Chromophor adsorbiert werden. Die auf den Gläschen gemessenen Absorptionsspektren zeigen einen beträchtlichen Untergrund (Streulicht, Interferenz). Dieser wird abgezogen, indem von 35o nm eine Tangente an die Absorptionskurve im langwelligen Bereich gelegt wird, wie in Abb.27 veranschaulicht ist.

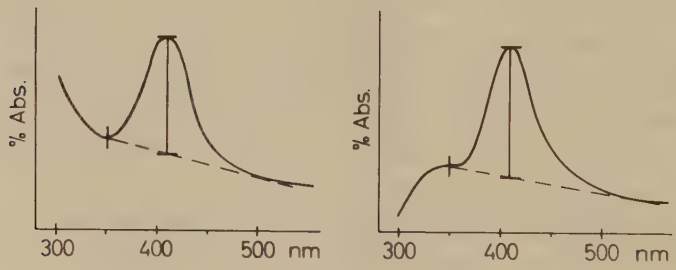


Abb.27 Kurvenformen der Soretbande von adsorbierten und aufgezogenen Methämoglobinschichten. Die Absorption im Maximum wird nach Abziehen des Untergrundes erhalten, wie in der Abbildung gezeigt wird.

Mit demselben Spektrometer, das für die Absorptionsmessungen gebraucht wird, werden die in § 5a beschriebenen Dickemessungen durchgeführt.

Die Apparatur zur Messung der Fluoreszenz aufgezogener Farbstoffschichten ist bei Möbius 1965 beschrieben.

9. Literaturverzeichnis

A.E.Alexander, MacRitchie J.Coll.Sci. 18,458 (1963)

A.E.Alexander, J.T.Pearson J.Coll.Sci. 27,53 (1968)

K.B.Blodgett J.Am.Chem.Soc. 57,1oo7 (1935)

R.Brüning Dissertation Marburg 1969

H.Bücher Diplomarbeit Marburg 1967

H.Bücher, O.v.Elsner, D.Möbius, P.Tillmann, J.Wiegand Z.f.Physik.Chem.N.F. 65,152 (1969)

D.Chapman Chem.Phys.Lip. 3,152(1969)

G.Colaccico, M.M.Rapport, D.Shapiro J.Coll.Sci. 25,5 (1967)

G.Colaccico J.Lip.Res. 9,562 (1968)

G.Colaccico J.Coll.Sci. 29,345 (1969)

J.F.Danielli, H.A.Davson J.cell.comp.Physiol. 5,495 (1935)

J.T.Davies, E.K.Rideal Interfacial Phenomena,New York 196o,p.369

K.H.Drexhage Habilitationsschrift Marburg 1966

D.D.Eley, H.G.Hedge J.Coll.Sci. 11,445 (1956)

D.D.Eley, H.G.Hedge Disc.Far.Soc. 21,221 (1956)

D.D.Eley, H.G.Hedge J.Coll.Sci. 12,419 (1957)

D.D.Eley, G.Miller Proceed.Third Int.Congr.Surface Activity 196o Köln,II,Sect.B p.157

O.v.Elsner Dissertation Marburg 1969

H.Fernandez-Moran Circulation 26,1o39 (1962)

J.B.Finean Intern.Rev.Cytol. 12,3o3 (1961)

Th.Förster Ann.Phys. 2,55 (1948)

H.S.Frank, M.W.Evans J.Chem.Phys. 13,5o7 (1945)

M.J.Fraser, J.H.Schulman J.Coll.Sci. 11,451 (1956)

D.E.Green, J.F.Perdue Proc.Natl.Acad.Sci.US. 55,1295 (1966)

R.Havemann, P.Wolf Z.Physik.Chem.Abt.A 2o1,246 (1952)

H.G.Hertz Buns.Ges. 68,9o7 (1964)

H.G.Hertz, G.Engel Ber.Buns.Ges. 72,8o8 (1968)

J.G.Kaplan, M.J.Fraser, J.H.Schulman J.Coll.Sci. 1o,44 (1955)

G.Kartha, J.Bello, D.Harker Nature 213,862 (1967)

W.Kreutz Z.Naturf. 23b,52o (1968)

W.Kreutz priv.Mitteilung (1969)

H.Kuhn et al. Phot.Sci.Eng. 11,233 (1967)

H.Kuhn et al. Molec.Cryst. 2,199 (1967)

Landau-Lifschitz Theoretische Physik Band V Berlin 1966 S.372

I.Langmuir Trans.Far.Soc. 15.3,62 (192o)

A.L.Lehninger Proc.Nat.Acad.Sci. 6o,1o69 (1968)

J.Lenard, S.J.Singer Proc.Nat.Acad.Sci. 56,1828 (1966)

Mahler-Cordes Biological Chemistry 1967 p.46, 6o

D.Möbius Dissertation Marburg 1965

D.Möbius, H.Bücher in A.Weissberger, B.W.Rossiter eds. Physical Methods of Organic Chemistry 4.Aufl. in Vorber.

P.Mueller, O.Rudin in Recent Progress in Surface Science eds. Danielli, Pankhurst, Riddifort 1964 p.364

B.A.Pethica, J.J.Betts Trans.Far.Soc. 52,1581 (1956)

J.Perrin C.R.hebd.Séances Acad.Sci. 184,1o97 (1927)

M.F.Perutz Proteins and Nucleic Acids 1962 p.37

A.Pockels Nature 43,437 (1891)

E.Racker, Y.Kagawa J.Biol.Chem. 241,2475 (1966)

J.D.Robertson Ann.N.Y.Acad.Sci. 137,421 (1966)

J.H.Schulman, P.Doty Disc.Far.Soc. 6,27 (1949)

J.H.Schulman, R.Matalon Disc.Far.Soc. 6,27 (1949)

J.H.Schulman Disc.Far.Soc. 21,272 (1956)

H.Sobotka, I.H.Sher J.Coll.Sci. 1o,125 (1955)

C.Tanford Physical Chemistry of Macromolecules 1963 p.359,395,517

P.Tillman Dissertation Marburg 1966

Verwey, Overbeek Theory of the Stability of Lyophobic Colloids 1948

D.F.Wallach, P.H.Zahler Proc.Nat.Acad.Sci. 56,1552 (1966)

D.F.Wallach, P.H.Zahler Biochem.Biophys.Acta 15o,186 (1968)

K.Weber, H.Sund Europ.J.Biochem. 1,4oo (1967)

J.Wiegand Dissertation Marburg 1968

H.Bergmeyer Methoden der enzymatischen Analyse Weinheim 1962

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans Kuhn, danke ich für die stete Förderung dieser Arbeit und für viele anregende Diskussionen.

Lebenslauf

Peter Fromherz, geboren am 8. Oktober 1942 in Ludwigshafen/Rhein

1949 - 1954	Primarschule in Schwyz (Schweiz)
1954 - 1961	Gymnasium am Kollegium Maria Hilf in Schwyz
1. 7. 1961	Matura Typ B am Kollegium Maria Hilf in Schwyz
Nov. 1961	Beginn des Chemiestudiums an der Technischen Hochschule Karlsruhe
15.11. 1963	Vordiplom in Chemie an der Technischen Hochschule Karlsruhe
Nov. 1965	Diplom-Hauptprüfung in Chemie an der Technischen Hochschule Karlsruhe; danach Diplomarbeit unter Anleitung von Dozent Dr.H.Volz am Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe, Thema der Diplomarbeit: " Dimere Indenoindole "
27. 7. 1966	Chemiediplom
Nov. 1966	Beginn der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof.Dr.H.Kuhn am Physikalisch-Chemischen Institut der Universität Marburg/Lahn; gleichzeitig Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle

Meine akademischen Lehrer waren
in Karlsruhe die Herren Professoren und Dozenten
Denk, Dworzak, Fritz, Scholder; Criegee, Hasse, Maier, Schröder, Volz; Brune, Franck, Schneider; Fitzer, Vollmert; Buckel, Falk, Kofink; Krawcyk, Strubecker;
in Marburg die Herren Professoren und Dozenten
Karlson, Witzel; Kuhn; Grossmann, Kraus, Ludwig, Madelung; Peyerimhoff.